

# **Die Modulation des Ubiquitin-Proteasom-Systems als Immunevasionsmechanismus des malignen Melanoms**

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologe Martin Keller

geboren am 21.01.1979 in Offenbach am Main

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter: 1. Prof. Dr. Peter-Michael Kloetzel

2. PD Dr. Annette Paschen

3. Prof. Dr. Wolfgang Lockau

Tag der mündlichen Prüfung: 20.07.2009

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
1.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)	2
1.1.1 Das 20S Proteasom	3
1.1.2 Regulatoren des 20S Proteasoms	6
1.1.3 Die ER-assoziierte Degradation (ERAD)	9
1.2 Die Antigenpräsentation von MHC Klasse I Liganden	10
1.2.1 Der Einfluss von Immunoproteasomen und PA28	12
1.3 Tumorimmunologie	14
1.4 Das maligne Melanom und Melan-A	18
1.5 Zielstellung	20
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>22</b>
2.1 Molekularbiologische Methoden	22
2.1.1 DNA-Amplifikation mittels PCR	22
2.1.2 RNA-Isolation	23
2.1.3 RT-PCR	23
2.1.4 DNA-Gelelektrophorese	23
2.1.5 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen und wässrigen Lösungen	23
2.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten	23
2.1.7 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ -Zellen	24
2.1.8 Transformation von <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	24
2.1.9 Gezielte Mutagenese	24
2.1.10 Plasmid-DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i>	25
2.1.11 Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen	25
2.1.12 DNA-Sequenzierung	25
2.1.13 Genexpressionsanalysen	25
2.2 Proteinbiochemische Methoden	25
2.2.1 Zellyse	25
2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	26
2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	26
2.2.4 Nativ-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (NATIVE-PAGE)	26
2.2.5 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen	26
2.2.6 Western Blot und Immunodetektion	27
2.2.7 <i>Strippen</i> von Nitrocellulosemembranen	28
2.2.8 Isolierung von 20S Proteasomen	29
2.2.9 Isolierung von PA28	30
2.2.10 Aktivitätstest von isolierten PA28	30
2.2.11 <i>In vitro</i> Prozessierung von Modellsubstraten durch das Proteasom	30
2.2.12 Massenspektrometrische Analyse der Prozessierungsprodukte	31
2.2.13 Densitometrische Auswertung von Gelbanden auf Röntgenfilmen	31
2.3 Zellkultur	31
2.3.1 Kultur humaner Zelllinien	31

2.3.2	Zellen	32
2.3.3	Einfrieren und Auftauen von humanen Zelllinien	32
2.3.4	Liposomale Transfektion	33
2.3.5	Isolation von peripheren mononukleären Zellen (PBMC)	34
2.3.6	Generierung von Melan-A <sub>26-35</sub> -spezifischen CTL	34
2.3.7	Amplifikation von CTL	34
2.4	Immunologische Methoden	35
2.4.1	Immunpräzipitation von Proteinen	35
2.4.2	Durchflusscytometrie – <i>Fluorescence activated cell-sorting</i> (FACS)	35
2.4.3	Antigenpräsentationsanalyse (CTL Assay)	36
2.4.4	Cytotoxizitätsassay ( <i><sup>51</sup>Cr release assay</i> )	36
2.4.5	Immenselektion von Melanomzellen	37
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>38</b>
3.1	Untersuchung der proteasomalen Generierung von Melan-A <sub>26-35</sub>	38
3.2	Modulation der Antigenpräsentation von Melan-A <sub>26-35</sub> durch Proteasomsubtypen	40
3.2.1	Die Degradation von Melan-A mit und ohne INF $\gamma$ -Exposition	41
3.2.2	Die Modulation der Antigenpräsentation von Melan-A <sub>26-35</sub> durch Immununtereinheiten	43
3.2.2.1	Einfluss von Immununtereinheiten auf die Antigenpräsentation von Melan-A <sub>26-35</sub>	43
3.2.2.2	Einfluss von Immununtereinheiten auf die Generierung von Melan-A <sub>26-35</sub>	46
3.2.3	Die Modulation der Antigenpräsentation von Melan-A <sub>26-35</sub> durch PA28	51
3.2.3.1	Einfluss von PA28 auf die Antigenpräsentation von Melan-A <sub>26-35</sub>	51
3.2.3.2	Einfluss von PA28 auf die Generierung von Melan-A <sub>26-35</sub>	53
3.2.4	Die Assoziation von PA28 und des 19S Regulators mit Proteasomsubtypen	57
3.3	Identifizierung weiterer Immunevasionsmechanismen von Melanomzellen	58
3.3.1	Selektion von Melanomzellen mit einer defizienten Antigenpräsentation von Melan-A <sub>26-35</sub>	59
3.3.2	Ausschluss bekannter Immunevasionsmechanismen von Melanomzellen	61
3.3.2.1	Expression von HLA-A*0201	61
3.3.2.2	Expression von Melan-A	63
3.3.2.3	Expression des TAP-Transporters	63
3.3.2.4	Resistenz gegenüber der CTL-vermittelten Cytolyse	64
3.3.2.5	INF $\gamma$ -Sensitivität und Expression INF $\gamma$ -induzierter Proteasomsubtypen	65
3.3.2.6	Einfluss von INF $\gamma$ auf die Antigenpräsentation	66
3.3.3	Expressionsanalysen immenselektionierter Melanomzellen	67
3.3.4	Einfluss der ER-assoziierten Degradation auf die Antigenpräsentation von Melan-A <sub>26-35</sub>	69
3.3.5	Rekonstitution der Antigenpräsentation von Melan-A <sub>26-35</sub>	72
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>75</b>
4.1	Immunevasionsmechanismen	76
4.2	Modulationen des UPS als Immunevasionsmechanismus	79
4.2.1	Defekte der ER-assoziierten Degradation als Resistenzmechanismus	80
4.2.2	Die Modulation der Generierung von Melan-A <sub>26-35</sub> durch IMP und IP	83
4.2.3	Die Modulation der Generierung von Melan-A <sub>26-35</sub> durch PA28	89
4.2.4	Einfluss von Proteasomsubtypen auf die Eliminierung von Melanomzellen	93
	<b>LITERATUR</b>	<b>96</b>

---

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>106</b>
<b>PUBLIKATIONEN</b>	<b>107</b>
<b>DANKSAGUNG</b>	<b>108</b>
<b>ERKLÄRUNG</b>	<b>109</b>



## ZUSAMMENFASSUNG

Die effiziente Präsentation von Tumorepitopen stellt einen kritischen Faktor zur Eliminierung von Tumorzellen durch die  $CD8^+$  cytotoxische T-Lymphozyten (CTL) vermittelte Immunantwort dar. Eine wichtige Rolle spielt in diesem Zusammenhang die effiziente Generierung von Tumorepitopen durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS). Veränderungen von Komponenten des UPS, die an der Degradation und Prozessierung von Antigenen beteiligt sind, können daher zur Immunevasion von Tumorzellen gegenüber CTL führen. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche UPS-assoziierte Immunevasionsmechanismen des malignen Melanoms identifiziert, die auf einer ineffizienten Präsentation des immundominanten Tumorepitops Melan-A<sub>26-35</sub> basieren.

Ein Mechanismus beruht auf den unterschiedlichen katalytischen Eigenschaften von Proteasomsubtypen, deren Expression durch  $INF\gamma$  induziert wird. Proteasomen, die einerseits die Immunountereinheiten  $\beta 1i$  und/oder  $\beta 2i$  beinhalten, oder andererseits mit dem Proteasomaktivator PA28 assoziiert sind, führen zu einer drastisch reduzierten Generierung des Tumorepitops Melan-A<sub>26-35</sub>. In beiden Fällen ist dies auf eine ineffiziente Prozessierung des N-Terminus des Epitops zurückzuführen.

Der andere Immunevasionsmechanismus steht im Zusammenhang mit der ER-assoziierten Degradation (ERAD), die den retrograden Transport von Proteinen aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) ins Cytosol zur proteasomalen Degradation beinhaltet. Durch Immunselektion mittels Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischen CTL wurden cytolyseresistente Melanomzellen identifiziert, deren Resistenz auf eine defiziente ER-assoziierte Degradation zurückzuführen ist. Dieser Defekt beruht auf einer verminderten Expression von ERAD-Komponenten, deren Reduktion die Verfügbarkeit des Antigens Melan-A zur proteasomalen Degradation und Generierung des immundominanten Epitops Melan-A<sub>26-35</sub> wesentlich limitiert.

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Intrazelluläre Proteine sind kontinuierlichen Synthese- und Degradationsprozessen unterworfen, die der Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase dienen. Sie ermöglichen der Zelle, die Integrität ihrer Proteine sicherzustellen und deren Aktivität zu regulieren. Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist in Eukaryoten das zentrale System zur Degradation von Proteinen im Nukleus und Cytoplasma (Ciechanover, 2005). Durch selektive Proteolyse gewährleistet es die Regulation zellulärer Prozesse wie Zellteilung, Differenzierung, Apoptose, Transkription, DNA-Reparatur, Signaltransduktion und Stressantwort (Coux *et al.*, 1996; Schwartz und Ciechanover, 1999; Wang und Maldonado, 2006). Des weiteren stellt das UPS in höheren Eukaryoten die zentrale Komponente zur Prozessierung von *major histocompatibility complex* (MHC) Klasse I Antigenen dar, die im Kontext von MHC Klasse I Molekülen an der Zelloberfläche CD8<sup>+</sup> cytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) präsentiert werden (Rock *et al.*, 1994). Die Quantität und Qualität antigener Peptide wird dabei durch die Effizienz und Spezifität des UPS determiniert, das dem Immunsystem die Erkennung und Zerstörung entarteter oder infizierter Zellen ermöglicht. Proteine sekretorischer Organellen erhalten Zugang zur proteasomalen Degradation und Prozessierung durch einen retrograden Transportmechanismus vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Cytosol – der so genannten ER-assoziierten Degradation (ERAD). Aberrationen des UPS führen zur Dysregulation der zellulären Homöostase und zur Entwicklung multipler Erkrankungen, wie z.B. malignen Entartungen, Autoimmunkrankheiten, neurodegenerativen und kardiovaskulären Erkrankungen (Wang und Maldonado, 2006).

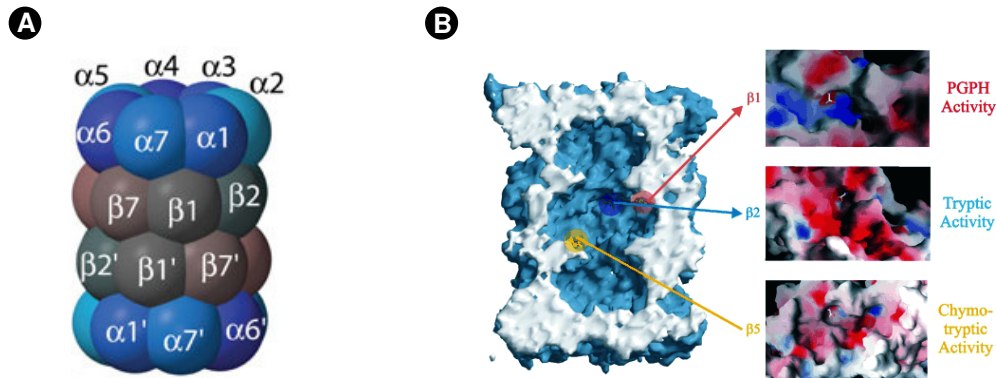
In der Regel wird die Selektivität der Proteindegradation durch Übertragung einer Ubiquitinkette (Polyubiquitin) auf das Proteinsubstrat ermöglicht. Diese Substrat-Markierung erfolgt durch eine Enzymkaskade, in der Ubiquitin (Ub) durch ein Ub-aktivierendes Enzym (E1) gebunden und über ein Ub-konjugierendes Enzym (E2) mittels einer Ub-Ligase (E3) auf das Substrat übertragen wird (Glickman und Ciechanover, 2002). Die Degradation polyubiquitinierten Proteine erfolgt über das 26S Proteasom als die hydrolytisch aktive Komponente des UPS. Es setzt sich aus dem 20S Proteasom, dem so genannten *core*-Partikel, mit den katalytisch aktiven Zentren und ein oder zwei 19S Regulatoren zusammen. Die Regulator-Komplexe erkennen Ub-markierte Substrate und deubiquitinieren, entfalten und translozieren sie in die proteolytische Kammer des 20S Proteasoms (Dahlmann, 2005).

### 1.1.1 Das 20S Proteasom

Die weite Verbreitung des 20S Proteasoms in Spezies aller drei Domänen und das ubiquitäre Vorkommen in Eukaryoten weist auf eine essentielle Bedeutung hin. Kristallstrukturen von 20S Proteasomen aus Archaeen, Eubakterien und Eukaryoten zeigen im Wesentlichen eine identische Grundstruktur (Groll *et al.*, 1997; Kwon *et al.*, 2004; Lowe *et al.*, 1995; Unno *et al.*, 2002). Die einzige Kristallstruktur eines Mammalia 20S Proteasoms ist die des Rindes, dessen Struktur mit der des Proteasoms aus *Saccharomyces cerevisiae* weitgehend übereinstimmt (Unno *et al.*, 2002). Diese Modelle ermöglichen die Aufklärung von Struktur-Funktions-Beziehungen und gewährleisten ein besseres Verständnis der katalytischen Prozesse innerhalb des Proteasoms.

Das 20S Proteasom ist ein zylindrischer Komplex, bestehend aus 28 Untereinheiten die in vier heptameren Ringen angeordnet sind. Die beiden äußeren Ringe sind aus  $\alpha$ -Untereinheiten, die beiden inneren aus  $\beta$ -Untereinheiten mit der Stöchiometrie  $\alpha 1-7/\beta 1-7/\beta 1-7/\alpha 1-7$  aufgebaut (Groll *et al.*, 1997) (**Abb. 1A**). Die Struktur des Proteasoms erzeugt drei Hohlräume: die beiden Vorkammern und die zentrale proteolytische Kammer. Die  $\alpha$ -Ringe formen jeweils eine Pore, das so genannte *gate*, und bilden den Zugang in das Proteasom (Groll *et al.*, 2000). In den zwei  $\beta$ -Ringen des Proteasoms sind sechs aktive Zentren lokalisiert, die in die proteolytische Kammer ragen. Die katalytisch aktiven Untereinheiten  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 5$  beherbergen jeweils ein aktives Zentrum (**Abb. 1B**). Die hydrolytische Aktivität geht vom N-terminalen Threonin (Thr1) aus, das als Nucleophil wirkt und ins Innere der Kavität ragt (Kloetzel, 2001). Es weist das Proteasom als N-terminale nukleophile Hydrolase aus. Um sowohl die Zellen vor unselektiver Proteolyse, als auch die N-terminalen Threonine vor einer Inaktivierung durch N- $\alpha$ -Acetylierung zu schützen, werden die katalytischen Untereinheiten als Propeptide synthetisiert. In Folge der Assemblierung des 20S Proteasoms werden die Propeptide autokatalytisch abgespalten und die endständigen Threonine freigesetzt (Arendt und Hochstrasser, 1999; Chen und Hochstrasser, 1996; Jager *et al.*, 1999). Innerhalb eines Proteins kann das 20S Proteasom nach fast jeder Aminosäure schneiden, allerdings weisen die katalytischen Untereinheiten Schnittpräferenzen auf, die mit Hilfe von fluorogenen Substraten ermittelt wurden. Die so definierten Schnittpräferenzen werden durch die Lokalisation der katalytischen Zentren in so genannten S1-Taschen (Substratbindungstasche 1) determiniert, deren Aminosäurezusammensetzung zwischen den katalytischen Untereinheiten divergiert (Groll *et al.*, 2005). Der Untereinheit  $\beta 1$  wurde aufgrund ihrer Präferenz für Schnitte nach sauren Aminosäuren die peptidylglutamylspaltende (PGPH) Aktivität zugewiesen,  $\beta 2$  durch bevorzugte Schnitte nach basischen Aminosäuren die trypsinähnliche (T-L) Aktivität und  $\beta 5$

wegen präferierter Schnitte nach hydrophoben Aminosäuren die chymotrypsinähnliche (ChT-L) Aktivität (Orlowski und Wilk, 2000).



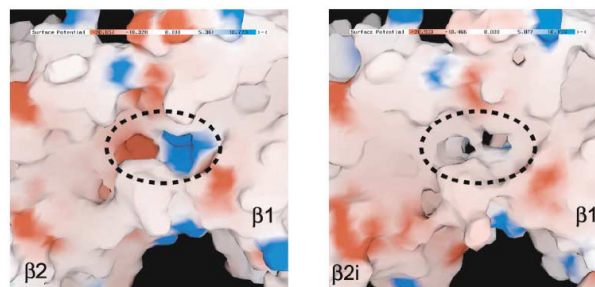
**Abb. 1: Topologie des 20S Proteasoms.** (A) Kugelmodell des 20S Proteasoms aus *Saccharomyces cerevisiae* in der Seitenansicht. (Abb. nach Rechsteiner und Hill, 2005) (B) Vertikaler Schnitt durch die Kristallstruktur des 20S Proteasoms. Das aktive Zentrum von β1 ist in orange, von β2 in blau und von β5 in gelb dargestellt. Die vergrößerten Bereiche zeigen die Oberflächenmodelle der katalytischen Zentren. Basische Atome sind als blaue, saure Atome als rote und hydrophobe Atome als weiße Oberflächen dargestellt. (Abb. nach Groll *et al.*, 2005)

Die durch das Proteasom generierten Fragmente variieren zwischen 3 und 25 Aminosäuren mit einer durchschnittlichen Länge von 7-8 Aminosäuren (Dahlmann, 2005). Untersuchungen zur Längenverteilung der generierten Peptide wurde mit 20S Proteasomen aus *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt, deren katalytische Untereinheiten β1 und β2 mittels Mutagenese der aktiven Threonine in Alanin inaktiviert wurden. Durch Mutation des katalytischen Threonins zu Alanin wird die Autokatalyse inhibiert, und es erfolgt eine unvollständige Prozessierung zu einem 8-9 Aminosäuren langen Propeptid, das die Substratbindung und Katalyse unterbindet (Groll *et al.*, 1999). *In vitro* Degradationsexperimente mit thermolabiler Enolase zeigten, dass der Abstand der katalytischen Threonine zueinander nicht für die Produktlänge entscheidend ist. Allerdings weisen die mutierten Proteasomen im Vergleich zum Wildtyp-Proteasom ein unterschiedliches Schnittmuster auf, das auf ihrem eingeschränkten katalytischen Profil beruht (Nussbaum *et al.*, 1998). Die S1-Taschen sowie weitere Bindungstaschen für Substrate der aktiven Zentren sind in etwa 7-8 Aminosäuren langen Bindungskanälen lokalisiert. Die Wahrscheinlichkeit der Proteolyse und die Schnittpräferenz sind abhängig von der Verweildauer des Substrats am katalytischen Zentrum, basierend auf seiner Affinität zu den Bindungstaschen des Kanals (Groll *et al.*, 2005). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Proteolyse ist demnach sowohl die Zugänglichkeit der Substrate in das Proteasominnere, als auch der Austritt der Produkte aus der zentralen Kammer.

Aufgrund divergenter Daten gibt es kontroverse Ansichten über mögliche Konformationsänderungen des 20S Proteasoms. Die Kristallstrukturen mutierter oder durch kovalent an die aktiven Zentren bindende Inhibitoren modifizierter Proteasomen weisen keine Unterschiede zu Wildtyp-Proteasomen auf (Groll *et al.*, 2005). Demgegenüber zeigen Rasterkraftmikroskopieaufnahmen Konformationsänderungen von 20S Proteasomen in Lösung (Osmulski und Gaczynska, 2000; Osmulski und Gaczynska, 2002) und auch kinetische Modelle mit spezifischen Substraten und Inhibitoren weisen auf allosterische Effekte innerhalb des Proteasoms hin (Kisselev *et al.*, 1999). Z.B. können saure Peptide durch Bindung an die S1 Taschen der PGPH Aktivität die allosterische Aktivierung der T-L Aktivität stimulieren (Kisselev *et al.*, 2002) sowie durch Bindung an nicht-katalytische Zentren (*modifier sites*) zu einer Inhibition der ChT-L Aktivität führen (Kisselev *et al.*, 2003; Myung *et al.*, 2001; Schmidtke *et al.*, 2000). Hydrophobe Peptide dagegen stimulieren durch Bindung an nicht-katalytische regulatorische Zentren die Peptidhydrolyse an allen sechs aktiven Zentren durch Öffnung des *gates* (Kisselev *et al.*, 2002). Die Kontroverse bezüglich proteasomaler Konformationsänderungen bei Kristallstrukturen auf der einen und Rasterkraftmikroskopieaufnahmen und kinetischen Modellen auf der anderen Seite könnte auf der artifiziellen Inflexibilität kristallisierter Proteasomen basieren, deren Strukturen, im Gegensatz zu den nativen Bedingungen bei der Rasterkraftmikroskopie und den kinetischen Untersuchungen, nur einen Konformationszustand zulassen.

INF $\gamma$ , ein immunmodulatorisches Cytokin, sezerniert von CTL und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), induziert die Expression von drei alternativen, katalytischen Untereinheiten:  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  und  $\beta 5i$ . Sie ersetzen bei *de novo* Synthese von Proteasomen die konstitutiven, homologen Untereinheiten  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 5$  und führen zur Assemblierung von Immunoproteasomen (Frentzel *et al.*, 1994; Griffin *et al.*, 1998). Der Einbau der Immununtereinheiten ist kooperativ beeinflusst (Griffin *et al.*, 1998; Groettrup *et al.*, 1997) und wird durch ihre Propeptide determiniert, die sich in ihrer Sequenz von ihren homologen, konstitutiven Pendants unterscheiden (De *et al.*, 2003; Kingsbury *et al.*, 2000). Durch den Einbau immunoproteasomaler Untereinheiten verändern sich die katalytischen Aktivitäten im Vergleich zum Standardproteasom. Untersuchungen mit Hilfe von fluorogenen Substraten zum Vergleich der katalytischen Aktivitäten von Immunoproteasomen und Standardproteasomen zeigen ein heterogenes Bild des katalytischen Profils. Während die PGPH Aktivität des Immunoproteasoms übereinstimmend reduziert ist, sind Veränderungen der T-L und ChT-L Aktivitäten nicht eindeutig definierbar (Orlowski und Wilk, 2000). Durch Strukturmodelle des 20S Proteasoms aus *Saccharomyces cerevisiae* und des Rindes wurden Vorhersagen über die Substitution von  $\beta 2$  und  $\beta 5$  durch  $\beta 2i$  und  $\beta 5i$  kalkuliert, die

keine grundlegenden Änderungen in den Anordnungen und Spezifitäten der S1 Taschen zeigen. Die Tasche von  $\beta 1i$  weist hingegen in den Modellen im Vergleich zu  $\beta 1$  einen apolareren Charakter auf, was die Reduktion der PGPH Aktivität erklären würde (Groll *et al.*, 1997; Unno *et al.*, 2002) (**Abb. 2**).



**Abb. 2: Strukturvergleich der aktiven Zentren von  $\beta 1$  und  $\beta 1i$ .** Oberflächenmodelle der aktiven Zentren von  $\beta 1$  (links) und  $\beta 1i$  (rechts) des Rindes. Basische Atome sind als blaue, saure Atome als rote und hydrophobe Atome als weiße Oberflächen dargestellt. Die S1 Taschen sind durch gestrichelte Linien umrandet. Die S1 Tasche des katalytischen Zentrums von  $\beta 1$  wird durch die Untereinheiten  $\beta 1$  und  $\beta 2$  gebildet. Während die S1 Tasche von  $\beta 1$  einen polaren Charakter aufweist, ist der Charakter der S1 Tasche von  $\beta 1i$  hydrophob. (Abb. nach Unno *et al.*, 2002)

Neben Standard- und Immunoproteasomen existieren Mischformen die konstitutive und Immununtereinheiten beinhalten, so genannte intermediäre Proteasomsubtypen (Dahlmann *et al.*, 2001; Dahlmann *et al.*, 2000; Klare *et al.*, 2007). Untersuchungen von HeLa-Zellen nach INF $\gamma$ -Exposition zeigen intermediäre Proteasomsubtypen als eine dominante Population, die eine asymmetrische Verteilung der konstitutiven Untereinheiten und Immununtereinheiten innerhalb der zwei  $\beta$ -Ringe aufweisen können. Sie unterscheiden sich in ihren katalytischen Aktivitäten und durch eine unterschiedliche subzelluläre Verteilung (Klare *et al.*, 2007).

### 1.1.2 Regulatoren des 20S Proteasoms

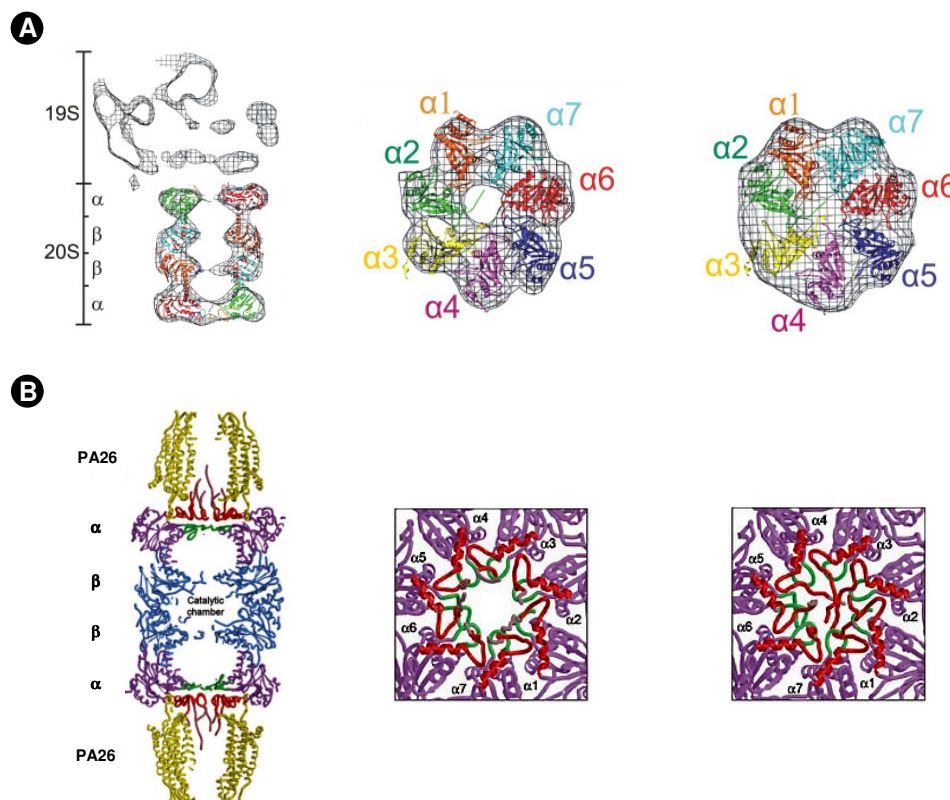
Die Kristallstruktur des 20S Proteasoms aus *Saccharomyces cerevisiae* zeigt das *gate* in einer geschlossenen Konformation. In diesem latenten, inaktiven Zustand ist der Zugang zur katalytischen Kammer durch die sieben N-Termini der  $\alpha$ -Untereinheiten vollständig verschlossen (Groll *et al.*, 1997). Der N-Terminus der  $\alpha 3$ -Untereinheit interagiert mit den N-Termini aller weiteren  $\alpha$ -Untereinheiten. Durch Deletion der ersten neun Aminosäuren von  $\alpha 3$  ( $\alpha 3\Delta N$ ) liegt das *gate* in einer offenen Konformation vor, so dass die Peptidaseaktivität des Proteasoms erhöht ist (Groll *et al.*, 2000). Hingegen zeigen Rasterkraftmikroskopieaufnahmen des 20S Proteasoms aus *Schizosaccharomyces pombe* in Lösung ein dynamisches Gleichgewicht zwischen der offenen und geschlossenen Konformation des *gates* mit einer Stabilisierung der offenen Konformation in

Anwesenheit von Peptidsubstraten (Osmulski und Gaczynska, 2000). Die Regulation des *gates* und folglich die Aktivität des Proteasoms *in vivo* erfolgt im Wesentlichen durch die Interaktion mit regulatorischen Komplexen, wie dem 19S Regulator (PA700) und dem Proteasomaktivator PA28 (11S Regulator). Sie können an einen oder beide  $\alpha$ -Ringe des Proteasoms binden.

Der 19S Regulator ist essentiell für die Degradation polyubiquitinerter Proteine. Er vermittelt über eine ATP-abhängige Bindung an das 20S Proteasom die Öffnung des *gates* (Proteasomassemblierung und Aktivierung), erkennt polyubiquitinierte Proteine (Substraterkennung), destabilisiert tertiäre Strukturen gefalteter Proteine (Substratentfaltung), transloziert die entfalteten Polypeptide in die Kavitäten des 20S Proteasoms (Substrattranslokation) und entfernt die Polyubiquitinketten von Substraten (Deubiquitinierung) (Liu *et al.*, 2006). Der Regulator ist in zwei Subkomplexe unterteilt, in *lid* und *base* (Glickman *et al.*, 1998). Während der *lid*, aufgebaut aus nicht-ATPasen, die Substraterkennung und Deubiquitinierung vermittelt (Verma *et al.*, 2002; Yao und Cohen, 2002), ist das *base*, aufgebaut aus zwei nicht-ATPasen und sechs unterschiedlichen AAA ATPasen, für die Substratentfaltung und die Öffnung des *gates* verantwortlich (Glickman und Ciechanover, 2002; Rubin *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2007). Die Bindung des 19S Regulators an die  $\alpha$ -Ringe des 20S Proteasoms induziert eine radiale Verlagerung der  $\alpha$ -Untereinheiten, die zur Öffnung des *gates* führt (**Abb. 3A**). Die Reorganisation der  $\alpha$ -Untereinheiten überträgt sich dabei auf die  $\beta$ -Untereinheiten und vergrößert den Radius des Zugangs von der Vorkammer zur proteolytischen Kavität (da Fonseca und Morris, 2008).

Der Regulator PA28 ist ein heptamerer ca. 200 kDa großer Komplex (Dubiel *et al.*, 1992; Ma *et al.*, 1992). Er ist aus den zwei INF $\gamma$  induzierbaren Untereinheiten PA28 $\alpha$  und PA28 $\beta$  (Ahn *et al.*, 1995), mit der Stöchiometrie  $\alpha_4\beta_3$  oder  $\alpha_3\beta_4$  (Zhang *et al.*, 1999), aufgebaut. PA28 bindet ATP-unabhängig an die  $\alpha$ -Ringe und stimuliert die Hydrolyse von fluorogenen Substraten, während die Degradation von nativen oder polyubiquitinierten Proteinen nicht beeinflusst ist (Dubiel *et al.*, 1992; Ma *et al.*, 1992). Die Aktivierung des Proteasoms durch Öffnung des *gates* wurde durch die Kristallstruktur des 20S Proteasoms aus *Saccharomyces cerevisiae* und dem PA28 Homolog PA26 aus *Trypanosoma brucei* gezeigt (Whitby *et al.*, 2000). Die C-Termini von PA26 inserieren in Taschen, gebildet durch benachbarte  $\alpha$ -Untereinheiten des Proteasoms, und induzieren Konformationsänderungen in den N-terminalen Strukturen der  $\alpha$ -Untereinheiten ungleich der Reorganisation ganzer  $\alpha$ -Untereinheiten durch Bindung des 19S Regulators (**Abb. 3B**). Dies führt zur Destabilisierung der geschlossenen Konformation und das *gate* ist geöffnet. PA28 bildet eine zentrale Pore mit einem Durchmesser von 30 Å auf der zum Proteasom gewandten Seite und

von 20 Å auf der abgewandten Seite (Rechsteiner *et al.*, 2000), die dem Durchmesser des geöffneten *gates* von ebenfalls 20 Å entspricht (Rabl *et al.*, 2008). Der Innenraum der Pore von PA28 besitzt einen überwiegend polaren Charakter, passend für den Ein- oder Austritt von kleinen, wasserlöslichen Peptiden (Knowlton *et al.*, 1997). Kinetische Studien bezüglich der Hydrolyse von fluorogenen Substraten zeigen eine Aktivierung des 20S Proteasoms durch PA28 mittels eines verbesserten Zu- oder Ausgangs von Substraten (Stohwasser *et al.*, 2000). Neben der Aktivierung von Proteasomen durch einen verbesserten Zu- oder Ausgang von Substraten (Stohwasser *et al.*, 2000) weisen Proteasom-PA28-Komplexe veränderte Schnittpräferenzen gegenüber 20S und 26S Proteasomen auf (Cascio *et al.*, 2002; Harris *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001; Sijts *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2002). Dies weist auf Konformationsänderungen des Proteasoms hin, die neben der Öffnung des *gates* ebenfalls die Substratbindungstaschen der aktiven  $\beta$ -Untereinheiten betreffen.



**Abb. 3: Die Öffnung des *gates* durch den 19S Regulator und PA28.** (A) Schematische Darstellung der Öffnung des *gates* durch Bindung des 19S Regulators an einen der  $\alpha$ -Ringe. Die Seitenansicht (links) und Kopfansicht (Mitte) zeigen die Vergrößerung des Radius des  $\alpha$ -Ringes durch den 19S Regulator, während der  $\alpha$ -Ring auf der gegenüberliegenden Seite geschlossen ist (rechts). (Abb. nach da Fonseca und Morris, 2008) (B) Struktur des PA26-20S Proteasom-Komplexes (links) und die Reorganisation der N-terminalen Reste der  $\alpha$ -Untereinheiten (rot) nach Bindung von PA26 (Mitte) im Vergleich zur geschlossenen Konformation ohne PA26 (rechts). (Abb. nach Whitby *et al.*, 2000)

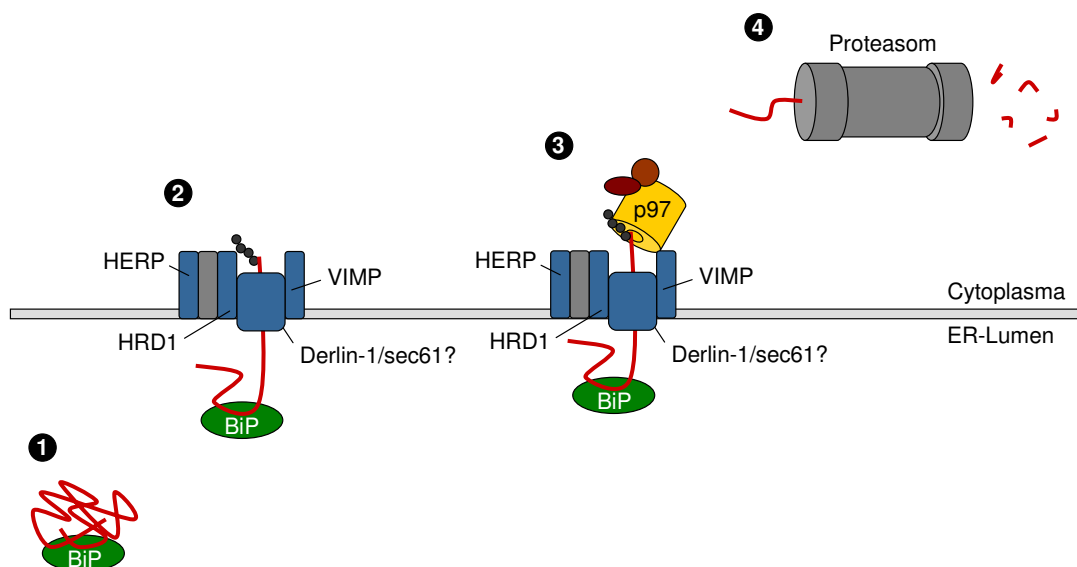


Die Expression von PA28 induziert die Assemblierung von Hybridproteasomen mit 19S Regulator auf der einen und PA28 auf der anderen Seite (Tanahashi *et al.*, 2000). Untersuchungen von Zellen nach INF $\gamma$ -Exposition zeigen eine Destabilisierung von 26S Proteasomen durch die Dephosphorylierung der proteasomalen Untereinheit  $\alpha 7$  (Bose *et al.*, 2004) bei gleichzeitiger Stimulierung der Expression von PA28. Ebenfalls wurde gezeigt, dass die Hydrolyse von ATP, benötigt zur Degradation polyubiquitinerter Substrate, zu einer transienten Dissoziation des 19S Regulators vom 20S Proteasom führt (Babbitt *et al.*, 2005). Beide Prozesse könnten zur Assemblierung von Hybridproteasomen führen und zur Bildung von Proteasomen mit PA28 an beiden Seiten. Messungen der Proteasomaktivität mit fluorogenen Substraten von Hybridproteasomen und Proteasomen mit PA28 oder 19S Regulatoren auf beiden Seiten zeigen keine Unterschiede in der Aktivität und implizieren eine ähnlich große Öffnung des *gates* durch PA28 und 19S (Kopp *et al.*, 2001).

### 1.1.3 Die ER-assoziierte Degradation (ERAD)

Proteine sekretorischer Organellen die ins ER synthetisiert werden und ER integrale Proteine, die Fehler in ihrer Faltung, Assemblierung oder Modifikationen aufweisen, werden vornehmlich über ERAD retrograd vom ER ins Cytosol transportiert und über das 26S Proteasom abgebaut (Nakatsukasa und Brodsky, 2008) (**Abb. 4**). Die Erkennung der meisten luminalen Proteine erfolgt über das Chaperon *binding protein* (BiP), während Transmembranproteine mit großen cytosolischen Domänen über cytosolische Chaperon-Systeme wie Hitzeschockproteine detektiert werden (Loureiro und Ploegh, 2006). Die Retrotranslokation von Proteinen über die ER-Membran erfolgt mittels eines Kanals, dessen Identifikation noch kontrovers diskutiert wird. Neben dem sec61 Komplex (Pilon *et al.*, 1997), verantwortlich für den Import von Proteinen ins ER, wird Derlin-1 vorgeschlagen (Lilley und Ploegh, 2004; Ye *et al.*, 2004). Mit nur wenigen Ausnahmen werden ERAD-Substrate vor ihrer Degradation ubiquitiniert. Die aktiven Domänen ER-lokalisierter E3-Ligasen wie HRD1 (Kikkert *et al.*, 2004) und gp78 (Fang *et al.*, 2001) weisen zur cytoplasmatischen Seite und erfordern zur Modifikation mit Polyubiquitin einen vorherigen Zugang der ERAD-Substrate zum Cytoplasma. Neben der Funktion als Degradationssignal dient Polyubiquitin ebenfalls zur Bindung der AAA ATPase p97 (VCP = *valosin containig protein*), die obligatorisch zur Retrotranslokation vieler ERAD-Substrate ist (Schmitz und Herzog, 2004). In Konjugation mit den Kofaktoren Ufd1 und Npl4 erfolgt die Rekrutierung zur ER-assoziierten Degradation (Ye *et al.*, 2001). Dieser Prozess wird Untersuchungen zu folge durch das Membranprotein *VCP interacting membrane protein* (VIMP) induziert (Ye *et al.*, 2004). Der

$p97^{Ufd1-Npl4}$ -Komplex extrahiert ubiquitinierte Substrate ins Cytosol durch einen nicht im Detail bekannten Mechanismus. Biochemische Studien implizieren, dass entweder durch die ATP-Hydrolyseaktivität von p97 das Substrat durch die Membran mittels des Retrotranslokons gezogen wird, oder  $p97^{Ufd1-Npl4}$  die Freilassung des bereits translozierten Substrats von der cytosolischen Seite der ER-Membran induziert (Loureiro und Ploegh, 2006). Mit Hilfe des *homocysteine-induced endoplasmic reticulum proteins* (HERP), einem möglichen Adapterprotein, dessen genaue Funktion nicht bekannt ist, bilden HRD1, p97, Derlin-1 und VIMP einen Komplex (Schulze *et al.*, 2005). Die ER-assoziierte Degradation ermöglicht so die Zufuhr von ER-ständigen Proteinen zum Proteasom, die zu MHC Klasse I Epitopen prozessiert werden können.



**Abb. 4: Die ER-assoziierte Degradation.** (1) Fehlgefaltete Proteine werden durch diverse Chaperone des ER wie BiP gebunden und zum putativen Retrotranslokator Derlin-1 oder sec61 transportiert. (2) Die Proteine werden über die Membran transloziert und durch E3-Ligasen wie HRD1 polyubiquitiniert. (3) Durch p97 mit den Kofaktoren Ufd1 und Npl4 werden die polyubiquitinierten Proteine erkannt und aus der ER-Membran extrahiert. (4) Die translozierten Proteine werden durch das Proteasom degradiert.

## 1.2 Die Antigenpräsentation von MHC Klasse I Liganden

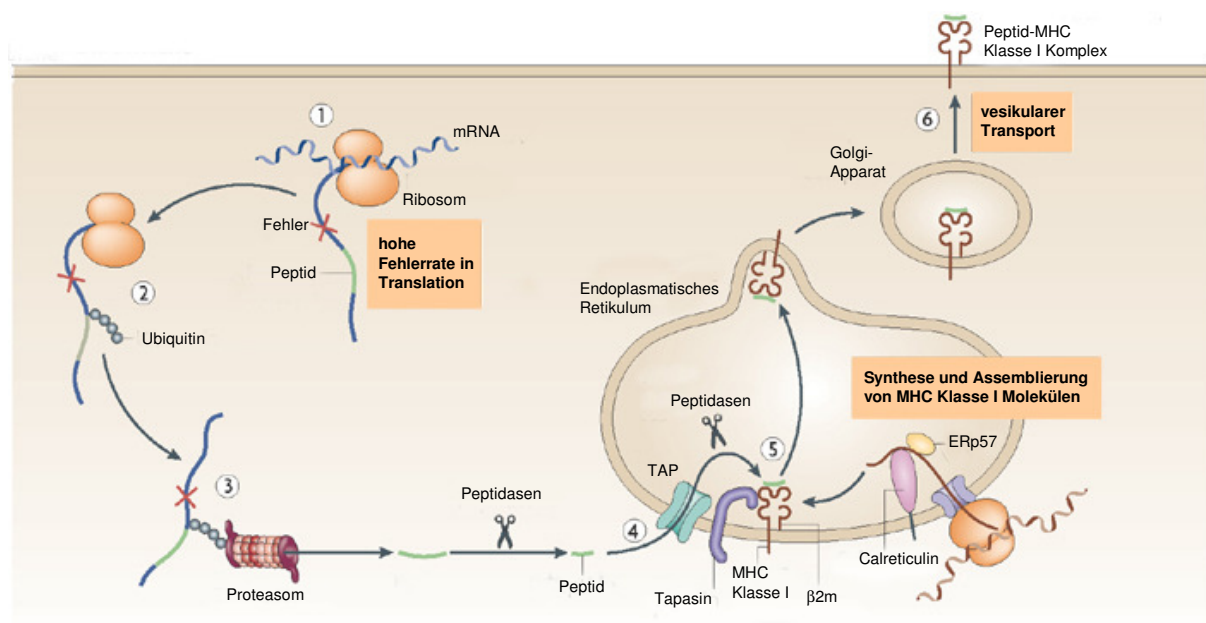
Die Generierung von Epitopen aus Antigenen wie Proteinen von Viren, Bakterien oder Tumorzellen, die auf MHC Klasse I Molekülen (beim Menschen auch HLA genannt; *human leukocyte antigen*) CTL präsentiert werden, erfolgt in der Regel im Cytosol durch das Proteasom. Damit auch die Generierung von Epitopen aus Antigenen sekretorischer Organellen, wie virale Hüllproteine oder bestimmten Tumorantigenen, gewährleistet ist, werden diese über ERAD ins Cytosol transportiert (Wang *et al.*, 1999). Die Aufgabe der Antigenprozessierung liegt neben der

Generierung hoch-affiner antigener Peptide (Liganden) zur Beladung von MHC Klasse I Molekülen in der Generierung ausreichender Mengen von Epitopen, die zur Auslösung einer effektiven Immunantwort nötig sind.

Als eine wichtige Quelle von MHC Klasse I Liganden wurde der Abbau neusynthetisierter, fehlgefalteter Proteine postuliert, den *defective ribosomal products* (DRiPs) (Schubert *et al.*, 2000; Yewdell, 2002). Sie bilden eine große Fraktion der *rapidly degraded proteins* (RDPs), die etwa 25 % aller neu synthetisierten Proteine ausmachen und innerhalb von wenigen Minuten durch das UPS abgebaut werden (Schubert *et al.*, 2000; Yewdell, 2002). Die Degradation von DRiPs ermöglicht dem Immunsystem zeitnah auf Infektionen zu reagieren, da Proteine in der Regel Halbwertszeiten von Minuten bis Wochen, mit einer mittleren Halbwertszeit von 1-2 Tagen, aufweisen (Goldberg und Dice, 1974). Dies spiegelt sich in der Beobachtung einer Studie zur Untersuchung der Antigenpräsentation von Epitopen des Influenza A Virus wider, die eine Aktivierung von anti-viralen CTL bereits eine Stunde nach der Infektion zeigte (Chen *et al.*, 2004).

Mit nur wenigen Ausnahmen generiert das Proteasom den korrekten C-Terminus von Epitopen mit hoher Effizienz, während der N-Terminus weniger genau definiert ist und in vielen Fällen N-terminal verlängert vorliegt (*Precursor*-Epitope) (Kloetzel, 2001; Rock *et al.*, 2002) (**Abb. 5**). Cytosolische Aminopeptidasen, wie *tripeptidyl peptidase II* (TPPII) oder *leucine aminopeptidase* (LAP) und ER-ständige, wie *endoplasmic reticulum aminopeptidase 1* (ERAP1) und ERAP2, können *Precursor*-Epitope für die Beladung auf MHC Klasse I Molekülen zur adäquaten Länge von durchschnittlich 8-10 Aminosäuren (Rammensee *et al.*, 1995) prozessieren (*trimming*) (Saveanu *et al.*, 2005). Allerdings werden mehr als 99 % der generierten Peptide durch Peptidasen weiter degradiert und verlieren ihre Eigenschaft, auf MHC Klasse I Molekülen präsentiert zu werden (Reits *et al.*, 2003). Die Translokation der Peptide in das ER zur Beladung von MHC Klasse I Molekülen erfolgt über den *transporter associated with antigen processing* (TAP Transporter), der aus den Untereinheiten TAP1 und TAP2 aufgebaut ist. MHC Klasse I Moleküle assemblieren im ER mit Hilfe der Chaperone Calnexin, BiP, Calreticulin und ERp57 durch die Assoziation von  $\beta$ 2-Mikroglobulin ( $\beta$ 2m) mit MHC Klasse I *heavy chain* (HC) (Garbi *et al.*, 2006). Die Assoziation des MHC Klasse I- $\beta$ 2m Komplexes mit Tapasin führt zur Bindung an den TAP Transporter und ermöglicht die Beladung des Komplexes mit einem Peptid. Die Stabilität des Komplexes wird dabei durch die Affinität zum Peptid bestimmt (Rammensee *et al.*, 1995). MHC Klasse I Moleküle bilden eine Peptidbindungsfurche (so genannte  $\alpha$ 1 $\alpha$ 2 Domäne), die durch einen hohen Polymorphismus ausgezeichnet ist. Die Bindungsspezifität des Liganden zur

Peptidbindungsfurche wird durch Aminosäurereste (Ankerreste) am N- und C-Terminus des Peptids determiniert, die in Haplotyp-spezifische Taschen der  $\alpha 1\alpha 2$  Domäne binden. (Fremont *et al.*, 1992). Die Mehrzahl C-terminaler Ankerreste stellen hydrophobe und basische Aminosäuren dar und stimmen mit den Schnittpräferenzen von Proteasomen (Kloetzel, 2004) und der Präferenz des TAP Transporters nach hydrophoben und basischen Aminosäuren am C-Terminus des zu translozierenden Peptides überein (Momburg *et al.*, 1994). Zur Erkennung durch CTL über den T-Zellrezeptor (TCR) in Konjugation mit kostimulatorischen Molekülen werden die MHC-Peptid-Komplexe über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran transportiert.



**Abb. 5: Die MHC Klasse I Antigenpräsentation.** Eine Quelle von MHC Klasse I Liganden stellen DRiPs dar (1), die zur Degradation polyubiquitiniert werden (2). Sie werden durch das 26S Proteasom zu Peptiden degradiert, die durch cytosolische Amino-peptidasen weiter prozessiert werden können (3). Über den TAP Transporter werden die Peptide in das ER transloziert (4), wo sie mit Hilfe von Chaperonen auf naszierende MHC Klasse I Moleküle geladen werden können (5). Der Transport der MHC Klasse I-Peptid-Komplexe zur Zelloberfläche erfolgt über den Golgi-Apparat (6). (Abb. nach Vyas *et al.*, 2008)

### 1.2.1 Der Einfluss von Immunoproteasomen und PA28

Obwohl im allgemeinen Proteasomen den C-Terminus von Epitopen effizient prozessieren, können sie ebenfalls die Antigenpräsentation verhindern, indem sie potenzielle MHC Klasse I Liganden zerstören oder den C-Terminus nicht korrekt generieren. Die Präferenz für eine bestimmte Schnittstelle beruht dabei nicht allein auf der ersten Aminosäure N-terminal vor der Schnittstelle (P1), sondern auch auf der Aminosäurezusammensetzung der flankierenden

Sequenzen um die Schnittstelle herum (Holzhutter *et al.*, 1999; Nussbaum *et al.*, 1998; Toes *et al.*, 2001).

Durch den Einbau der INF $\gamma$ -induzierbaren Immunountereinheiten verändert sich das katalytische Profil und damit die Schnittpräferenzen des 20S Proteasoms, die beim Vergleich von Standard- mit Immunoproteasomen zu unterschiedlichen aber auch überlappenden Peptid-Poolen führen (Toes *et al.*, 2001). Zusätzlich verändern intermediäre Proteasomsubtypen die Qualität der generierten Peptide (Dahmann *et al.*, 2000). Im Allgemeinen werden Immunoproteasomen mit einer effizienteren Antigenpräsentation assoziiert, da sie konstitutiv in Zellen lymphatischer Organe wie Lymphknoten, Milz und Thymus exprimiert sind (Stohwasser *et al.*, 1997) und eine bestimmte Zahl von Epitopen, die hauptsächlich viralen Ursprungs sind, verstärkt generieren (Sijts *et al.*, 2000; Sijts *et al.*, 2000; Van den Eynde und Morel, 2001; van Hall *et al.*, 2000). Durch *in vitro* Prozessierungsexperimente mit aufgereinigten Proteasomen und Epitop-beinhaltenden Modellsubstraten wurden anhand der Analysen der Prozessierungsfragmente zwei Mechanismen identifiziert, die für die unterschiedliche Antigenpräsentation verantwortlich sind. Die Prozessierungen der Epitope führten entweder zu einer effizienteren Generierung der C-Termini der Epitope durch Immunoproteasomen oder aber die Epitope wurden durch Standardproteasomen verstärkt innerhalb der Epitopsequenz geschnitten und damit zerstört, während Immunoproteasomen keine Präferenz für interne Schnitte zeigten. Im Gegensatz dazu werden ein paar wenige bekannte Epitope deutlich ineffizienter durch Immunoproteasomen generiert, die mit Ausnahme eines viralen Epitops aus nichtmutierten körpereigenen Proteinen (Selbstantigenen) stammen (Basler *et al.*, 2004; Chapiro *et al.*, 2006; Van den Eynde und Morel, 2001). Insbesondere sind Epitope des malignen Melanoms von der verminderten Generierung durch Immunoproteasomen beschrieben worden, deren Proteine in den Organellen der Melaninsynthese (Melanosomen) lokalisiert sind, wie *melanoma antigen-A* (Melan-A), gp100 und Tyrosinase. Für die Epitope gp100<sub>209-217</sub> und Tyrosinase<sub>369-377</sub> wurde eine Präferenz von Immunoproteasomen zu Schnitten innerhalb der Epitopsequenz gezeigt, die das Epitop zerstören (Chapiro *et al.*, 2006). Der Mechanismus, dem die verminderte Prozessierung des immundominanten Epitops Melan-A<sub>26-35</sub> durch Immunoproteasomen zu Grunde liegt, wurde noch nicht im Detail geklärt. Eine Untersuchung zeigt eine stark verminderte Generierung des C-Terminus eines *Precursor*-Epitops von Melan-A<sub>26-35</sub> durch Immunoproteasomen (Chapatte *et al.*, 2006).

PA28, das in Zellen mit spezialisierter antigenpräsentierender Funktion erhöht konstitutiv exprimiert ist, führt zu einer verbesserten Generierung bestimmter Epitope und ist für das

Melanom-assoziierte Epitop TRP2<sub>360-368</sub> sogar essentiell (Strehl *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2002). Allerdings werden viele Epitope auch ohne PA28 effizient generiert, und eine Induktion in Zellen führt nicht zu erhöhten Mengen von Epitopen auf MHC Klasse I Molekülen an den Zelloberflächen (Kloetzel, 2004). Das zeigt, dass PA28 keine essentielle Rolle *per se* innerhalb der Antigenpräsentation zukommt. Die Förderung der Generierung durch PA28 bei bestimmten Epitopen resultiert nicht aus einem erhöhten Gesamtproteinabbau oder von einer Präferenz für neuetablierte Schnittstellen. Hingegen zeigen detaillierte Untersuchungen des Effekts von PA28 auf die Generierung von Epitopen, dass Proteasomen mit PA28 bereits etablierte aber untergeordnete Schnittstellen mit höherer Präferenz nutzen. Dies führt bei einigen Epitopen zu einer effizienteren Prozessierung von Epitopen die zwischen Schnittstellen liegen, die ohne PA28 mit niedrigerer Präferenz genutzt werden (Dick *et al.*, 1996; Kuckelkorn *et al.*, 2002; Stoltze *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2002). Ein Modell zur Erklärung der Modulation der Schnittpreferenzen des Proteasoms durch PA28 basiert auf der durch PA28 induzierten Öffnung des *gates*, die den Ein- oder Austritt von Substraten ins Proteasom erleichtert und dadurch die Qualität von Prozessierungsprodukten beeinflussen kann (Stohwasser *et al.*, 2000; Whitby *et al.*, 2000). Allerdings erklärt das Modell nicht vollständig die Modulationen der Schnittpreferenzen und insbesondere den Einfluss von PA28 auf nur bestimmte Epitope. Vielmehr deuten Untersuchungen an, dass PA28 Konformationsänderungen des Proteasoms induziert, die zu veränderten Affinitäten des Substrats zu den Bindungstaschen der katalytischen Untereinheiten führen (Harris *et al.*, 2001; Sijts *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2002; Textoris-Taube *et al.*, 2007).

Die Expression von Immunoproteasomen und von PA28 kann demnach weitreichende Folgen in der Erkennung von infizierten Zellen oder Tumorzellen haben, die zu einer Eliminierung oder aber auch zu einer Resistenz dieser Zellen gegenüber CTL führen kann. Insbesondere die Erkennung von Zellen des malignen Melanoms durch CTL kann durch die Expression von Immunoproteasomen aufgrund der ineffizienten Generierung bestimmter Epitope drastisch reduziert sein und zur Immunevasion dieses Tumortyps beitragen.

### 1.3 Tumorimmunologie

Tumore können aufgrund ihrer genetischen Instabilität multiple Mechanismen entwickeln, die sie der Kontrolle des Immunsystems entziehen (Immunevasionsmechanismen). Innerhalb der MHC Klasse I vermittelten Immunüberwachung basieren sie überwiegend auf Veränderungen der Qualität und Quantität von Antigenen, von MHC Klasse I Molekülen und der Expression

immunsuppressiver Moleküle. CTL stellen dabei die Haupteffektorzellen zur Kontrolle des Tumorwachstums dar, indem sie spezifische Epitope erkennen und die Cytolyse der betreffenden Zellen induzieren können. Die Cytolyse wird dabei durch zwei Mechanismen vermittelt. Zum einen über Rezeptoren auf den Oberflächen von Zellen, beispielsweise für FasL oder TNF- $\alpha$ , die nach Bindung des Liganden über eine Signalkaskade die Apoptose der betreffende Zelle auslösen, und zum anderen über die Sekretion von Perforin/Granzym. Perforin vermittelt dabei den Eintritt von Granzym, das die schnelle Apoptose der Zelle induziert.

Die Effektivität der CTL-vermittelten Erkennung von Tumorzellen basiert zu großen Teilen auf einer effizienten MHC Klasse I Antigenpräsentation, so dass Veränderungen der MHC Klasse I Expression einen signifikanten Einfluss auf die Progression von Tumoren ausüben können. Akkumulationen von MHC Klasse I Anomalien sind oft mit fortgeschrittener Metastasierung und Progression von Tumoren assoziiert und führen in der Regel zu einer schlechten klinischen Prognose der Tumorkranken (Amiot *et al.*, 1998; Bontkes *et al.*, 1998; Garrido *et al.*, 1997). Immunhistochemische Untersuchungen zeigen Anomalien der MHC Klasse I Expression als ein häufiges Phänomen verschiedener Tumorentitäten. Z.B. weisen 63 % der Melanome (Garrido und Algarra, 2001), 88,5 % der Brustkarzinome (Cabrera *et al.*, 1996) und 74 % der Kolorektalkarzinome (Maleno *et al.*, 2004) verschiedene Formen von abnormalen MHC Klasse I Expressionen auf. Die Defekte der MHC Klasse I Expression beruhen dabei auf strukturellen Veränderungen wie Mutationen in Genen, kodierend für  $\beta 2m$ , MHC Klasse I HC und TAP, den Verlust des HLA Haplotyps (*LOH = Loss of HLA Haplotype*), der transkriptionellen Dysregulation von MHC Klasse I Genen und Komponenten der Antigenprozessierungsmaschinerie (APM) sowie epigenetischen Defekten (Aptsiauri *et al.*, 2007). Allerdings stellen Tumorzellen, die keine MHC Klasse I Moleküle mehr exprimieren, Ziele der NK-vermittelten Cytolyse dar, so dass *in vivo* die Etablierung von Phänotypen, die eine verminderte Expression von MHC Klasse I Molekülen aufweisen, eine Resistenz gegenüber dem Immunsystem effektiver begünstigen als der totale Verlust der Expression.

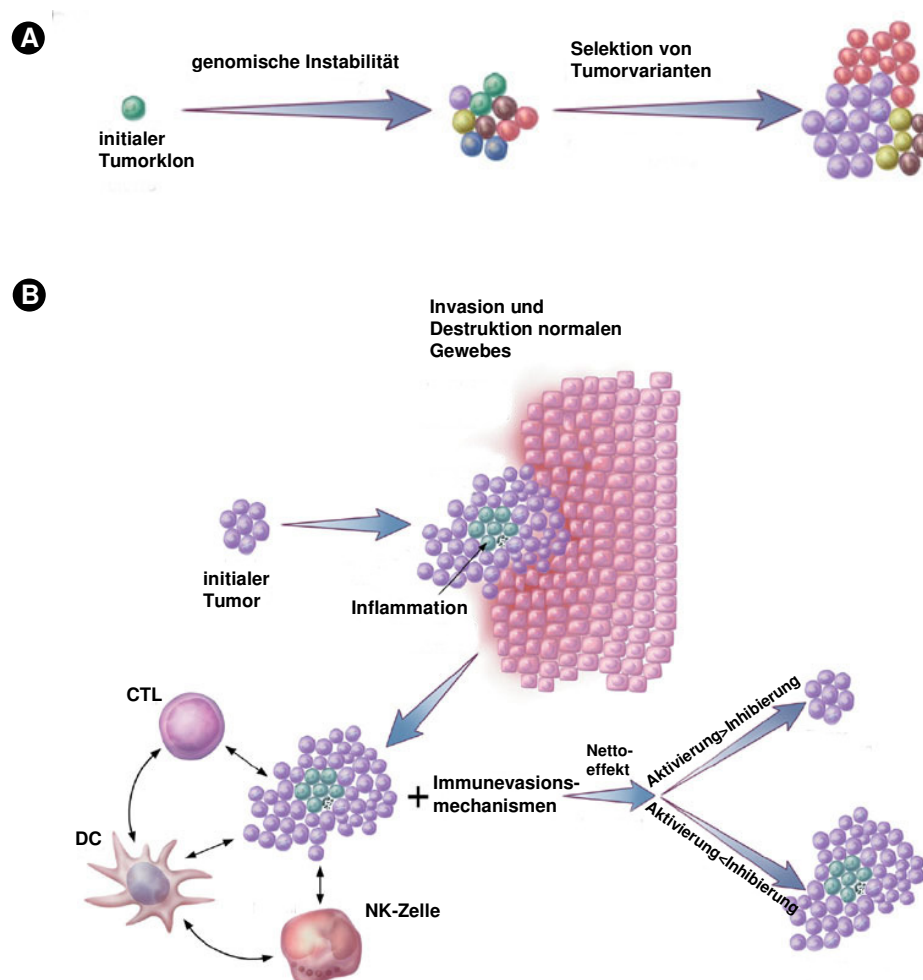
Ebenfalls kann die Sekretion immunsuppressiver Cytokine zur Immunevasion von Tumorzellen führen. Beispielsweise beeinflusst *transforming growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) die Aktivität von CTL und NK-Zellen negativ (Castriconi *et al.*, 2003; Thomas und Massague, 2005). Auch die Sekretion von Interleukin 10 (IL 10), das die Aktivität und Proliferation dendritischer Zellen inhibiert (Neuner *et al.*, 2002), kann negative Folgen für die CTL-Antwort haben. Die Erkennung von Zellen mittels CTL wird durch professionelle antigenpräsentierende Zellen initiiert, insbesondere durch dendritische Zellen, die über die Präsentation von MHC Klasse I restringierten Antigenen und

kostimulatorischen Signalen die Proliferation naiver Antigen-spezifischer CTL stimulieren. Inflammationen, Infektionen oder die Schädigung von Geweben führen zur Maturierung und Migration dendritischer Zellen zu lymphatischen Organen wo die Aktivierung naiver CTL induziert wird (Adams *et al.*, 2005). Darüber hinaus können Tumorzellen der CTL-vermittelten Cytolyse entgehen, indem sie vermindert Fas-Rezeptoren oder im Gegensatz dazu Inhibitoren der Fas/FasL-vermittelten Apoptose exprimieren (Aptsiauri *et al.*, 2007). In diesem Kontext wurde gezeigt, dass Tumorzellen die Expression des Liganden FasL induzieren können und dadurch die Eliminierung von Fas<sup>+</sup> CTL vermitteln können, während sie selber aufgrund ihres entwickelten Resistenzmechanismus gegenüber der Fas/FasL-induzierten Apoptose der Selbsteliminierung entgehen (Rivoltini *et al.*, 2002).

Daneben können Tumorzellen die Expression von Proteinen induzieren, die normalerweise durch die Zelldifferenzierung reguliert sind, aber während malignen Transformationen ektopisch exprimiert werden können. Diese aberrant exprimierten Proteine, die Tumor-assoziierten Antigene (TAA), können im Kontext von MHC Klasse I Molekülen durch CTL erkannt werden und zur Eliminierung der Tumorzellen führen. Eine Gruppe der TAA, die Differenzierungsantigene, umfasst beim malignen Melanom Proteine wie Tyrosinase (Brichard *et al.*, 1993), gp100 (Bakker *et al.*, 1994) und Melan-A (Kawakami *et al.*, 1994), die ebenfalls von Melanozyten exprimiert werden. Eine verminderte Expression oder der Verlust dieser Antigene ist oft mit einer Progression des Tumors verbunden (Berset *et al.*, 2001). Dies kann zumindest zum Teil damit assoziiert sein, dass jedes dieser Antigene ein immundominantes Epitop trägt. Immundominante Epitope induzieren, im Vergleich zu anderen Epitopen relativ schnell eine Immunantwort. Dies kann dazu führen, dass parentale Tumorzellen, so lange wie sie das immundominante Epitop dem Immunsystem präsentieren, Tumorvarianten schützen, die keines mehr exprimieren, indem sie die CTL-Antwort auf das immundominante Epitop forcieren (*priority of the first response*) (Schreiber *et al.*, 2002). Die Immundominanz von Epitopen kann demnach Evasionsvarianten fördern, in dem die Forcierung der CTL-Antwort auf den parentalen Tumor das Zeitfenster für die Evasionsvarianten zur Entwicklung weiterer Resistenzmechanismen vergrößert. Die verminderte Expression der Differenzierungsantigene des malignen Melanoms wird dabei durch CTL und dendritische Zellen gefördert, die neben INF $\gamma$  das Cytokin Oncostatin M sezernieren. Beide haben einen negativen Effekt auf die Expression der genannten Antigene (Durda *et al.*, 2003; Le Poole *et al.*, 2002). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Oncostatin M ebenfalls von manchen Melanomzellen selbst exprimiert werden kann (Kurnick *et al.*, 2001).



Doch auch das Immunsystem kann zur Progression von Tumoren beitragen, indem es die Ausprägung des immunogenen Phänotyps von Tumoren beeinflusst (**Abb. 6**). Beispielsweise werden Tumorzellen mit hoher MHC Klasse I Expression und Immunogenität effizient durch CTL erkannt und eliminiert und Zellen, die keine Expression von MHC Klasse I Molekülen mehr aufweisen, durch NK-Zellen cytolysiert. Allerdings können Zellen, die eine intermediäre MHC Klasse I Expression aufweisen, sich sowohl der CTL als auch der NK vermittelten Cytolyse entziehen. Die Kombination der genetischen Instabilität von Tumorzellen mit der Immunselektion durch CTL und NK-Zellen führt demnach zu Immunevasionsmechanismen im Darwinistischen Sinne. Der Selektionsdruck des Immunsystems fördert in Folge dessen nicht nur die Eliminierung von Tumorzellen, sondern ebenfalls die Etablierung von neuen Evasionsvarianten mit einer erhöhten Tumorigenität (*cancer immunoediting*) (Dunn *et al.*, 2004).



**Abb. 6: Die Generierung von Immunevasionsphänotypen und ihre Rolle bei der Tumorprogression. (A)** Die genomische Instabilität führt zu einer genetischen Diversität von Tumoren. Das Immunsystem selektiert Tumorvarianten, die eine verminderte Immunogenität aufweisen. **(B)** Während der Progression des Tumors kommt es zur Invasion und Destruktion von dem den Tumor umliegenden Gewebe. Durch diese Dysbalance der Gewebekomöostase und der darauf folgenden Mobilisierung und Infiltration von Leukozyten kommt es zur Inflammation und zur weiteren Rekrutierung von Immunzellen. Aufgrund der Selektion von Tumorvarianten mit etablierten Immunevasionsmechanismen, wie die Sekretion immunsuppressiver Cytokine oder einer verminderten MHC Klasse I Expression, entscheidet die Ausprägung der Effekte, ob eine effiziente Aktivierung der Immunantwort induziert werden kann oder ob mögliche inhibitorische Effekte der Tumorzellen überwiegen. (Abb. nach Khong und Restifo, 2002)

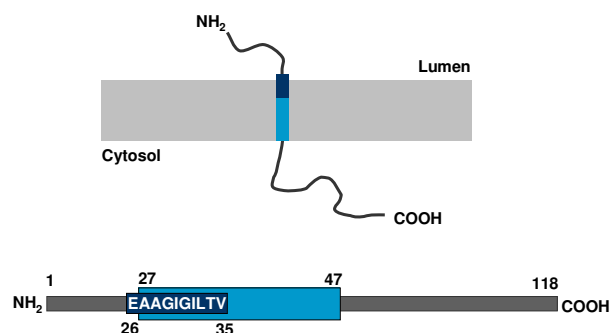
## 1.4 Das maligne Melanom und Melan-A

Das maligne Melanom ist ein Tumor der aus Melanozyten, den Zellen der Melanin-Synthese, hervorgeht und sich überwiegend kutan manifestiert (**Abb. 7A**). Während Australien mit 50-60 Fällen pro 100 000 Einwohner und Jahr die höchste Inzidenz aufweist, beträgt sie 10-12 Fälle in Mitteleuropa (Dissemond und Grabbe, 2006). Es wird prognostiziert, dass sich zukünftig die Inzidenz alle 10 Jahre verdoppeln wird (Schaffer *et al.*, 2004). Die 10-Jahres-Überlebensrate beträgt 75-80 %, wobei Männer eine signifikant schlechtere Prognose als Frauen aufweisen. Während das maligne Melanom im Initialstadium in der Regel chirurgisch therapierbar ist, neigen größere Tumore zu frühzeitiger Metastasierung mit drastisch sinkenden 10-Jahres-Überlebensraten (Dissemond und Grabbe, 2006). Der Entwicklung maligner Melanome liegen sowohl endogene Faktoren wie genetische Dispositionen als auch exogene Faktoren wie UV-Exposition zu Grunde. In fortgeschrittenen Krankheitsstadien des malignen Melanoms existieren bislang keine suffizienten Therapiemöglichkeiten. Allerdings liegt ein zukunftsweisender Weg in der weiteren Entwicklung und Optimierung von Vakzinierungstherapien, die auf eine effektive konzentrierte CTL-Antwort abzielen und auf dendritischen Zellen als Vektoren, aufgrund ihrer Regulation der CTL-vermittelten Immunität, basieren.

**A**



**B**



**Abb. 7: Das maligne Melanom und die Membrantopologie von Melan-A. (A)** Bild eines malignen Melanoms (Abb. nach Schultz und Schuler, 2005). **(B)** Membrantopologie (oben) und Domänen (unten) von Melan-A. Das Epitop Melan-A<sub>26-35</sub> ist in dunkelblau und die Transmembrandomäne in hellblau dargestellt. Die Zahlen beziehen sich auf die Positionen der Aminosäuren der jeweiligen Domänen.

Das Melanom- und Melanozyten-spezifische Protein Melan-A ist ein ideales Zielantigen für Immuntherapien, da es zu ca. 90 % in primären sowie zu ca. 80 % in metastasierenden Melanomen exprimiert wird (De Maziere *et al.*, 2002) und oft im Vergleich zu Melanozyten eine erhöhte Expression in Melanomzellen aufweist (Held *et al.*, 2008). Des Weiteren wurden häufig Melan-A-spezifische CTL-Erkennungen *in vivo* detektiert (Van den Eynde und Boon, 1997). Melan-A ist ein Typ III Membranprotein ohne Konsensussequenzen für N-terminale Signalpeptide und N-Glykosylierungsstellen und ist im ER, *trans-Golgi-network* (TGN) und Melanosomen lokalisiert (De Maziere *et al.*, 2002). Seine genaue Funktion ist nicht bekannt, allerdings indizieren Untersuchungen eine Funktion in der Melanosomenmaturierung (Hoashi *et al.*, 2005). Seine Degradation wird sowohl über das UPS als auch durch Lysosomen über Ubiquitin vermittelt (Levy *et al.*, 2005). Insbesondere das Epitop Melan-A<sub>26-35</sub> ist ein wichtiges Ziel von Vakzinierungstherapien, da es immundominant in HLA-A\*0201<sup>+</sup> Individuen auftritt (Bettinotti *et al.*, 1998) und gezeigt wurde, dass die Vakzinierungstherapie mit Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischen CTL zu signifikanten Tumorregressionen von Melanopatienten führt und die Immunisierung mit Melan-A<sub>26-35</sub>-Peptiden deutliche CTL-Antworten auslösen kann (Dudley *et al.*, 2002; Speiser *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu den weiteren bekannten HLA-A\*0201 spezifischen Melanom-assoziierten Epitopen, wie Tyrosinase, gp100 und TRP2, die in der extracytosolischen Domäne lokalisiert sind, ist Melan-A<sub>26-35</sub> mit Ausnahme der ersten Aminosäure (Glu<sup>26</sup>) in die Transmembrandomäne des Proteins eingebettet (Rimoldi *et al.*, 2001) (**Abb. 7B**). Neben dem 10mer Epitop (Melan-A<sub>26-35</sub>) beinhaltet die Sequenz ein zweites Epitop (Melan-A<sub>27-35</sub>), ein 9mer, das sich allein durch das Fehlen der Aminosäure Glu<sup>26</sup> unterscheidet.

Der Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischen CTL-Erkennung kann demnach eine wichtige Rolle in der Immuntherapie des malignen Melanoms zukommen, allerdings hängt ihr Erfolg von der Identifizierung und Charakterisierung der Resistenzmechanismen des malignen Melanoms ab, deren Etablierung die Effektivität solcher Therapien obstruieren könnte.

## 1.5 Zielstellung

Die Heterogenität immunevasiver Mechanismen von Tumoren stellt eine große Hürde in der Entwicklung effektiver Immuntherapien dar.  $CD8^+$  cytotoxische T-Lymphozyten (CTL) sind die Haupteffektorzellen zur Kontrolle des Tumorwachstums. Die Implementierung von T-Zell-basierten Immuntherapien wird allerdings erschwert durch Aberrationen von MHC Klasse I Antigenen maligner Zellen, die zu einer Immunevasion führen können. Der Fokus dieser Arbeit sollte auf Untersuchungen von Immunevasionsmechanismen gelegt werden, die auf Veränderungen von Komponenten des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) als das zentrale System zur Generierung von MHC Klasse I Epitopen basieren. Das maligne Melanom stellt aufgrund einer großen Zahl bekannter Tumor-assoziiierter Antigene und der Identifikation tumorspezifischer CTL, hierfür einen besonders geeigneten Modelltumor dar.

Das immundominante Epitop Melan-A<sub>26-35</sub> des malignen Melanoms ist eines der wenigen bekannten Epitope, dessen Antigenpräsentation durch die  $INF\gamma$ -induzierte Expression von Immunoproteasomen drastisch reduziert ist. Der genaue Mechanismus, dem die verminderte Präsentation zu Grunde liegt, wurde allerdings bisher nicht geklärt, noch ist bekannt welchen Einfluss intermediäre Proteasomsubtypen und PA28, deren Expression ebenfalls durch  $INF\gamma$  induziert wird, auf die Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> ausüben. Daher sollten die Auswirkungen jeder dieser Komponenten des Proteasomsystems einzeln und in Kombination

auf die Generierung bzw. Präsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> *in vitro* und im zellulären System analysiert werden.

In einem zweiten Ansatz sollten Zellen aus einem metastasierenden malignen Melanom, die eine Resistenz gegenüber Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischen CTL entwickelt haben, mit Hilfe eines Immunselektionssystems isoliert werden. Die einzelnen resistenten Zellen sollten im Folgenden auf Resistenzmechanismen untersucht werden, die in einem direkten Zusammenhang zur Antigenprozessierungsmaschinerie des UPS stehen. Nach der Identifikation von Defekten, die zur Resistenz führen können, sollten diese z. B. durch Transfektion einzelner Komponenten verifiziert werden, indem die Sensibilität gegenüber Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischen CTL rekonstituiert wird.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.1.1 DNA-Amplifikation mittels PCR

PCR-Ansatz (50  $\mu$ l): 5  $\mu$ l *High Fidelity* 10x PCR-Puffer mit  $MgCl_2$  (Roche Diagnostics); 0,5  $\mu$ l *forward* und *reverse* Primer (Stammlsg.: 50  $\mu$ M) (NEB); 1  $\mu$ l dNTP-Mix (Stammlsg.: 10 mM je dNTP) (NEB); 0,5  $\mu$ g DNA; 0,5  $\mu$ l *High Fidelity* DNA-Polymerase (Roche Diagnostics)

Die verwendeten Oligonukleotide (BioTeZ Berlin-Buch GmbH) sind in Tab. 1 aufgeführt. Die PCR-Parameter wurden entsprechend der Länge und dem G/C Gehalt der Oligonukleotide, so wie der Länge der amplifizierten Sequenz gewählt (Tab. 2).

Tab. 1: Oligonukleotide

Name	Sequenz
GAPDH.for	5'-CCGTCAAGGCTGAGAACGGG-3'
GAPDH.rev	5'-GCCATGCCAGTGAGCTTCCC-3'
HRD1.for	5'-GCAATGTTCCGCACGGCAGTG-3'
HRD1.rev	5'-GACATTGTCCATTGCCTGGA-3'
VIMP.for	5'-CCCCGGTACCCATCCATGGAACGCCAAGAGGAGTC-3'
VIMP.rev	5'-CCCCCGGTACCGACATAAAAAATAAATATACAGA-3'
Melan-A.for	5'-CCCCAAGCTTGATCCATGCCAAGAGAAGATGCTCA-3'
Melan-A.rev	5'-CCCGGTACCAGGTGAATAAGGTGGTGGTGACT-3'
Melan-A.sol.for	5'-GACAGTGATCCTGGGAAAGAAGAAGGTCTTACTGCTCATC-3'
Melan-A.sol.rev	5'-GATGAGCAGTAAGACCTTCTTCTTTCCCAGGATCACTGTC-3'

Tab. 2: PCR Schema

PCR Programm	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95° C	5 min	1
Denaturierung	95° C	5 min	30
Annealing	55-70° C	5 min	
Elongation	72° C	1-3 min	
Finale Elongation	72° C	5 min	1

### 2.1.2 RNA-Isolation

Die Isolation von RNA erfolgte mit dem *HighPureRNA Isolation Kit* (Roche Diagnostics) nach Angaben des Herstellers. Die isolierte RNA wurde bei -80° C gelagert.

### 2.1.3 RT-PCR

Zur reversen Transkription der RNA in cDNA wurden 2 µl der isolierten RNA eingesetzt. Die RT-PCR wurde mit dem *First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche Diagnostics) nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 2.1.4 DNA-Gelelektrophorese

50x TAE-Puffer: 2 M Tris/Essigsäure pH 8,0; 50 mM EDTA

Agarosegel: 0,7 %, 1 % oder 1,2 % (w/v) Agarose; 0,2 µg/ml Ethidiumbromid; 1x TAE-Puffer

6x DNA-Probenpuffer: 0,1 % (w/v) Bromphenolblau; 0,1 % (w/v) Xylencyanol; 50 % (v/v) Glycerin; 1x TAE-Puffer

Zur Trennung der DNA-Probe wurde diese mit DNA-Probenpuffer versetzt und bei einer Spannung von 100 V in 1x TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA wurde auf einem UV-Tisch detektiert.

### 2.1.5 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen und wässrigen Lösungen

Zur Aufreinigung der DNA wurde das *GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers verwendet.

### 2.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit dem *Quick Ligation Kit* (NEB) nach Herstellerangaben. Zur Ligation von PCR-Produkten wurde das *TOPO TA Cloning® Kit* (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers verwendet.

### 2.1.7 Herstellung kompetenter *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen

$\varphi$ a-Medium: 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 2 % (w/v) Bactotrypton, 40 mM MgSO<sub>4</sub>; pH 7,6; autoklavieren

TFB I: 30 mM KOAc; 100 mM RbCl; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 50 mM MnCl<sub>2</sub>; 15 % (v/v) Glycerin; pH 5,8; sterilfiltrieren

TFB II: 10 mM MOPS; 75 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM RbCl; 15 % (v/v) Glycerin; sterilfiltrieren

LB-Medium: 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt; 1 % (w/v) Bacto-Trypton; 100 mM NaCl

LB-Agar: LB-Medium; 2 % (w/v) Bacto-Agar

DH5 $\alpha$ -Zellen aus einem Glycerinstock wurden auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und ü.N. bei 37° C inkubiert. Es wurden 5 ml  $\varphi$ a-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und ü.N. bei 37° C geschüttelt. 100 ml  $\varphi$ a-Medium wurden mit 2 ml der Übernachtskultur angeimpft. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5 wurde die Kultur für 5 min auf Eis gekühlt und anschließend 5 min bei 6000 rpm und 4° C pelletiert. Das Zellpellet wurde in 40 ml eiskaltem TFB I resuspendiert, 15 min bei 4° C inkubiert und erneut zentrifugiert. In 4 ml eiskaltem TFB II wurde das Pellet resuspendiert und für 15 min bei 4° C inkubiert. Die Zellen wurden in vorgekühlten Eppendorf-Gefäßen zu je 50  $\mu$ l aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C aufbewahrt.

### 2.1.8 Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$

LB-Agar: siehe 2.1.7

Ampicillin (AppliChem): Stammlösung 100 mg/ml, Endkonzentration: 100  $\mu$ g/ml

Chemisch kompetente *E. coli* DH5 $\alpha$  -Zellen wurde auf Eis aufgetaut, mit 1  $\mu$ g Plasmid-DNA bzw. 10  $\mu$ l Ligationsansatz oder dem gesamten *TOPO TA Cloning*®-Ansatz versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 30 sec bei 42° C und einer zweiminütigen Abkühlung auf Eis wurden die Zellen mit 250  $\mu$ l SOC-Medium (Invitrogen) versetzt und für 1 h bei 37° C unter Schütteln inkubiert. Es wurden 50  $\mu$ l auf Ampicillin-haltigen LB-Agar ausplattiert und bei 37° C ü.N. inkubiert.

### 2.1.9 Gezielte Mutagenese

Für die Insertion spezifischer Mutationen in Plasmid-DNA wurde das *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) nach Herstellerangaben verwendet.



### 2.1.10 Plasmid-DNA-Isolierung aus *E. coli*

Die Plasmidisolierungen mit dem *Qiagen Plasmid Mini Kit*, (Qiagen) und dem *Qiagen Plasmid Maxi Kit* (Qiagen) wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 2.1.11 Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen

Die spektralphotometrische Analyse von Nukleinsäuren erfolgte im Photometer durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $A_{260}$ ). Die Konzentration errechnet sich aus dem Wert bei  $A_{260}$ , multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor und dem Faktor 0,05 µg/µl, welcher der DNA-Konzentration bei  $A_{260}=1$  entspricht. Der Faktor zur Berechnung der RNA-Konzentration beträgt 0,04 µg/µl.

### 2.1.12 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde von AGOWA GmbH Berlin durchgeführt.

### 2.1.13 Genexpressionsanalysen

Für die Analyse der Genexpression wurde RNA nach 2.1.2 isoliert. Hybridisierung und Datenanalyse wurden von der Firma Signature Diagnostics nach Ebstein *et al.* mit *Human U133 2.0 Plus-Array* (Affymetrix) durchgeführt (Ebstein *et al.*, 2008).

## 2.2 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.1 Zellyse

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Zellen in 20-100 µl *M-PER<sup>®</sup> Mammalian Protein Extraction Reagent* (Thermo Scientific) mit *Complete<sup>™</sup> Protease Inhibitors* (Roche Diagnostics) aufgenommen und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach 20 min Zentrifugation bei 14000 rpm und 4° C wurde der Überstand als Gesamtzelllysat abgenommen.

### 2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Proteingehalt wurde mit *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad) nach Angaben des Herstellers bestimmt.

### 2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

4x SDS-Probenpuffer: 250 mM Tris/HCl pH 7; 40 % (v/v) Glycerin; 16,7 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol; 9 % (w/v) SDS; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau

Sammelgel 5 %: 167 mM Tris/HCl pH 6,8; 5 % (v/v) Acrylamid; 0,1 % (w/v) SDS; 0,07 % (w/v) APS; 0,05 % (v/v) TEMED

Trenngel 15 %: 375 mM Tris/HCl pH 8,8; 15 % (v/v) Acrylamid; 0,1 % (w/v) SDS; 0,07 % (w/v) APS; 0,05 % (v/v) TEMED

SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris; 200 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS

Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgt nach dem Protokoll von Lämmli (1970). Die Proben wurden mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95° C denaturiert und auf ein Gel aufgetragen.

### 2.2.4 Nativ-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (NATIVE-PAGE)

Lysepuffer: 50 mM Tris; 50 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 % (v/v) Glycerin

4x Probenpuffer: 200 mM BisTris-HCl pH 6,8; 200 mM NaCl; 40 % (v/v) Glycerin; 0,004 % (w/v) Bromophenolblau

Laufpuffer: 50 mM BisTris; 50 mM Tricine; pH 6,8

Die Zellen wurden im Lysepuffer 3x in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei 20° C im Wasserbad aufgetaut. Nach 20 minütiger Zentrifugation bei 14000 rpm und 4° C wurde der Überstand abgenommen und weiterverwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte mit NativePAGE™ Novex® 3-12 % Bis-Tris Gel System (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers.

### 2.2.5 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Coomassie-Lösung: 30 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250

Entfärber: 30 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure

Die Polyacrylamidgele wurden für 1 h in Coomassie-Lösung inkubiert und anschließend, bis der Hintergrund relativ frei von Farbstoff war, entfärbt.

## 2.2.6 Western Blot und Immunodetektion

Transferpuffer: 25 mM Tris; 200 mM Glycin; 25 % (v/v) Methanol

Amidoschwarz-Lösung: 45 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 0,1 % (w/v) Amidoschwarz

10x PBS: 1,37 M NaCl; 27 mM KCl; 81 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; (pH 7,2 mit HCl einstellen)

PBST: 1x PBS; 0,4 % (v/v) Tween-20

Blocklösung: 1x PBS; 5 % (w/v) Magermilchpulver; 0,4 % (v/v) Tween-20

Antikörper-Lösung: 1x PBS; 2 % (w/v) Magermilchpulver; 0,1 % (v/v) Tween-20

Der elektrophoretische Transfer auf Nitrocellulose-Membranen (Millipore) erfolgte im *semi-dry* -Verfahren. Das Polyacrylamidgel und die Nitrocellulose-Membran wurden zwischen je drei Lagen in Transferpuffer getränktes Whatman-Papier (Schleicher und Schuell) in die Blot-Apparatur (PeqLab) mit der Membranseite zur Anode positioniert. Der Transfer erfolgte bei 400 mA für 90 min. Zur Überprüfung des Proteintransfers wurde die Membran mit Amidoschwarz-Lösung angefärbt und anschließend mit Wasser wieder entfärbt. Das Absättigen der Membran in Blocklösung erfolgte für 1 h bei RT. Die Bindung des primären Antikörpers (Tab. 3) wurde ü.N. bei 4° C durchgeführt. Am nächsten Tag wurde die Membran 5x für 10 min in PBST gewaschen und anschließend für 1 h bei RT mit dem sekundären Antikörper (Tab. 4) inkubiert. Nach weiteren fünf Waschschritten mit PBST wurde das Signal mit *ECL Plus Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers und einem Röntgenfilm *Xomat-UV/AR/Biomax-MR* (Kodak) detektiert.

Tab. 3: Primäre Antikörper

Name	Verdünnung	Herkunft
anti-Melan-A	1:500	Novocastra
anti-p97	1:10000	R. Hartmann-Petersen, University of Copenhagen
anti-VIMP	1:1000	T. Rapoport, Harvard University
anti-Derlin-1	1:1000	T. Rapoport, Harvard University
anti-HERP	1:100000	M. Seeger, Charité-Universitätsmedizin Berlin
anti-HRD1	1:1000	Abgent
anti-TAP1	1:1000	Rockland
anti-TAP2	1:1000	NBL
anti-GAPDH	1:30000	Santa Cruz Biotechnology
anti- $\beta$ -Actin	1:10000	Santa Cruz Biotechnology
anti-Polyubiquitin-Konjugate (FK2)	1:2000	Biomol
anti-S1	1:2000	Biomol
anti- $\beta$ 1	1:10000	P.-M. Kloetzel, Charité-Universitätsmedizin Berlin
anti- $\beta$ 2	1:5000	P.-M. Kloetzel, Charité-Universitätsmedizin Berlin
anti- $\beta$ 5	1:3000	P.-M. Kloetzel, Charité-Universitätsmedizin Berlin
anti- $\beta$ 1i	1:5000	P.-M. Kloetzel, Charité-Universitätsmedizin Berlin
anti- $\beta$ 2i	1:10000	P.-M. Kloetzel, Charité-Universitätsmedizin Berlin
anti- $\beta$ 5i	1:30000	P.-M. Kloetzel, Charité-Universitätsmedizin Berlin
anti-PA28 $\alpha$	1:5000	P.-M. Kloetzel, Charité-Universitätsmedizin Berlin
anti-PA28 $\beta$	1:1000	Cell Signaling Technology

Tab. 4: Sekundäre Antikörper

Name	Verdünnung	Herkunft
anti-Kaninchen IgG POD	1:5000	Dianova
anti-Maus IgG POD	1:5000	Seramun

## 2.2.7 *Strippen* von Nitrocellulosemembranen

*Stripping*-Puffer: 62,5 mM Tris HCl pH 6,8; 2 % (w/v) SDS; 0,8 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol

Die Membran wurde in *Stripping*-Puffer für 45 min bei 50° C inkubiert. Es folgte das Waschen der Membran unter laufendem Wasser für 1 h und im Anschluss mit PBST (2.2.6) für 5 min.

### 2.2.8 Isolierung von 20S Proteasomen

10x TEAD: 200 mM Tris/HCl pH 7,8; 10 mM EDTA; 10 mM NaN<sub>3</sub>; 10 mM DTT

Lysepuffer: 1x TEAD; 50 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 % (v/v) NP40; *Complete™ Protease Inhibitors* (Roche Diagnostics)

TEAD-50: 1x TEAD; 50 mM NaCl

TEAD-150: 1x TEAD; 150 mM NaCl

TEAD-350: 1x TEAD; 350 mM NaCl

PufferA: 1x TEAD; 100 mM NaCl; (filtriert)

PufferB: 1x TEAD; 1 M NaCl; (filtriert)

1x TEA: 20 mM Tris/HCl pH 7,8; 1 mM EDTA; 1 mM NaN<sub>3</sub>

Aktivitätstestansatz: 1x TEA; 20 µM Z-GLL-AMC (Bachem)

Saccharosegradienten: 10-40 % (w/v) Saccharose in 1x TEA

Die Isolierung von 20S Proteasomen wurde aus 3-5x 10<sup>8</sup> Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden in 10 ml eiskalten Lysepuffer resuspendiert, in einem Dounce-Homogenisator (30 Hübe) aufgeschlossen und für 30 min bei 16000 rpm zentrifugiert. Das Zelllysate wurde für 1 h bei 4° C mit äquilibrierten DEAE Sephacel (GE Healthcare) inkubiert. Anschließend wurde das DEAE Sephacel in eine Säule überführt und mit eiskalten TEAD-50 gewaschen, bis der Durchlauf einen Proteingehalt unter 0,07 bei A<sub>280</sub> aufwies. Es folgte die Eluierung der gebundenen Proteine mit gekühltem TEAD-350 in 2 ml Fraktionen. Die Fraktionen wurden einem Aktivitätstest unterzogen, indem 10 µl der Fraktionen mit 90 µl Aktivitätstestansatz für 1 h bei 37° C inkubiert und anschließend im Fluorometer (BioTec) (Extinktion: 390 nm; Emission: 460 nm) vermessen wurde. Die proteolytisch aktiven Fraktionen wurden vereinigt und mittels Ammoniumsulfat gefällt. Im ersten Fällungsschritt erfolgte die Zugabe von Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 35 % unter ständigem Rühren auf Eis. Nach 30 min Rühren wurde die Probe für 10 min bei 15000 rpm und 4° C abzentrifugiert. Der Überstand wurde einem weiteren Fällungsschritt unterzogen, bei dem Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 80 % zugegeben wurde und die Probe 30 min auf Eis gerührt wurde. Es folgte die Zentrifugation für 20 min bei 15000 rpm und 4° C. Das Pellet wurde in 600 µl TEAD-50 gelöst und auf einen 10-40 %igen Saccharosegradienten geladen. Die Zentrifugation wurde bei 40000 rpm für 16 h und 4° C durchgeführt. Die Gradienten wurde in 600 µl Fraktionen aufgeteilt und auf Proteasomaktivität getestet. Proben mit hoher enzymatischer Aktivität wurden vereinigt, 1:10 mit PufferA verdünnt,

filtriert und anschließend in der ÄktaFPLC (GE Healthcare) auf eine MonoQ-Säule (GE Healthcare) geladen. Der Stufengradient verlief von 0 zu 20 % PufferB in 3 min, von 20 bis 35 % in 20 min und zum Schluss ein Reinigungsschritt auf 100 % PufferB in 3 min. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Die 1 ml Fraktionen wurden einem Aktivitätstest unterzogen und die proteolytisch aktiven Fraktionen dementsprechend vereinigt. Die Proben wurden in TEAD-50 umgepuffert und mit Centricon® Plus-20 (Millipore) nach Angaben des Herstellers aufkonzentriert.

### 2.2.9 Isolierung von PA28

Die Isolierung von PA28 aus humanen Erythrozyten wurde von Burkhardt Dahlmann (Charité-Universitätsmedizin Berlin) nach Kuehn und Dahlmann durchgeführt (Kuehn und Dahlmann, 1996).

### 2.2.10 Aktivitätstest von isolierten PA28

Aktivitätspuffer: 20 mM HEPES; 20 mM DTT; 2 mM Mg(Ac)<sub>2</sub>; pH 7,8

Substrat: 100 µM Suc-LLVY-AMC (Bachem)

Modellsubstrat Melan-A<sub>15-40</sub>-Stocklösung: 3 mg/ml Peptid; 20 % (v/v) DMF

Zum Aktivitätspuffer wurden 100 µM Substrat, 0,027 µg/µl Proteasom und 0,027 µg/µl PA28 hinzugegeben und für 1 h bei 37° C inkubiert. Gegebenenfalls wurde zum Ansatz 0,135 µg/µl des Modellsubstrat Melan-A<sub>15-40</sub> (siehe 2.2.11) hinzugefügt. Anschließend wurde der Aktivitätsansatz im Fluorometer (BioTec) (Extinktion: 390 nm; Emission: 460 nm) vermessen.

### 2.2.11 *In vitro* Prozessierung von Modellsubstraten durch das Proteasom

Verdau-Puffer: 20 mM HEPES; 20 mM DTT; 2 mM Mg(Ac)<sub>2</sub>; pH 7,8

Modellsubstrat Melan-A<sub>15-40</sub> Stocklösung: 3 mg/ml Peptid; 20 % (v/v) DMF

Die *in vitro* Prozessierung durch das Proteasom wurden mit dem Modellsubstrat Melan-A<sub>15-40</sub> (KGHGHSYT<sup>\*</sup>TAEAAAGIGILTVILGVL) durchgeführt. Es wurde 0,027 µg/µl Proteasom und 0,135 µg/µl Peptid eingesetzt. Bei der *in vitro* Prozessierung in Anwesenheit von PA28 wurde auf 1 µg Proteasom 1 µg PA28 eingesetzt, was einem ca. 3-fachen Überschuss von PA28 entspricht.

Die *in vitro* Prozessierung erfolgte bei 37° C für die angegebene Zeitdauer. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 % TFA abgestoppt.

### 2.2.12 Massenspektrometrische Analyse der Prozessierungsprodukte

Die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden durch Kathrin Textoris-Taube (Charité-Universitätsmedizin Berlin) nach Sun *et al.* durchgeführt (Sun *et al.*, 2002).

### 2.2.13 Densitometrische Auswertung von Gelbanden auf Röntgenfilmen

Die Proteinquantifizierung mittels densitometrischer Auswertung von Gelbanden erfolgte nach dem Einscannen von Röntgenfilmen *Xomat-UV/AR/Biomax-MR* (Kodak) mit dem Computerprogramm ImageJ, NIG. Die Auswertung wurde nach Angaben des Programmherstellers durchgeführt.

## 2.3 Zellkultur

### 2.3.1 Kultur humaner Zelllinien

RPMI-Medium: RPMI-Medium (Biochrom); 10 % (v/v) FCS (hitzeinaktiviert) (Biochrom); 100 U/ml Penicillin (Seromed); 100 µg/ml Streptomycin (Seromed)

BASAL ISCOVE-Medium: BASAL ISCOVE-Medium (Biochrom); 10 % (v/v) FCS (hitzeinaktiviert) (Biochrom); 100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin; 2 mM L-Glutamin (Biochrom)

Die Kultivierung erfolgte bei 37° C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit in Begasungsbrutschränken. Das BASAL ISCOVE-Medium zur Kultivierung der stabilen HeLa Transfektanten Zelllinie SP wurde mit 2 µg/ml Puromycin (PAA) und im Fall aller weiteren stabilen HeLa Transfektanten mit zusätzlichen 6 µg/ml Hygromycin B (Roche) versetzt. Adhärenz Zellen wurden vor der Ernte mit PBS gewaschen und mit *Accutase* (PAA) nach Angaben des Herstellers abgelöst und ausgesät. Suspensionszellen wurden vor der Passagierung für 5 min, 1000 rpm und 4° C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in Medium resuspendiert und die Zellsuspension in entsprechenden Verdünnungen ausgesät.

### 2.3.2 Zellen

Zellen	Spezifikation
<i>Melanomzelllinien</i>	
UKRV-Mel-15a (benannt als Mel 15)	Melan-A <sup>+</sup> , HLA-A*0201 <sup>+</sup>
Ma-Mel-91 (benannt als Mel 91)	Melan-A <sup>-</sup> , HLA-A*0201 <sup>+</sup>
Mel 15 Klone	selektionierte und klonal expandierte Mel 15-Zellen; resistent gegenüber Melan-A <sub>26-35</sub> -spezifischen CTL
<i>Stabile HeLa<sup>HLA</sup> Transfektanten</i>	
SP	HLA-A*0201 <sup>+</sup>
IMP <sup>β5i</sup>	HLA-A*0201 <sup>+</sup> , β5i <sup>+</sup>
IMP <sup>β1i</sup>	HLA-A*0201 <sup>+</sup> , β1i <sup>+</sup>
IMP <sup>β2i</sup>	HLA-A*0201 <sup>+</sup> , β2i <sup>+</sup>
IMP <sup>β5i+β1i</sup>	HLA-A*0201 <sup>+</sup> , β5i <sup>+</sup> , β1i <sup>+</sup>
IMP <sup>β5i+β2i</sup>	HLA-A*0201 <sup>+</sup> , β5i <sup>+</sup> , β2i <sup>+</sup>
IMP <sup>β1i+β2i</sup>	HLA-A*0201 <sup>+</sup> , β1i <sup>+</sup> , β2i <sup>+</sup>
IP	HLA-A*0201 <sup>+</sup> , β5i <sup>+</sup> , β1i <sup>+</sup> , β2i <sup>+</sup>
<i>B-Zelllinie</i>	
EBV-B	Epstein-Barr Virus transformierte B-Lymphozyten Zelllinie
<i>Primärzellen</i>	
periphere mononukleäre Zellen (PBMC)	
<i>CD8<sup>+</sup> cytotoxische T-Lymphozyten (CTL)</i>	
CTL Klon 10	Melan-A <sub>26-35</sub> -spezifische CTL

### 2.3.3 Einfrieren und Auftauen von humanen Zelllinien

Einfriermedium: RPMI- oder BASAL ISCOVE-Medium (2.3.1); 20 % (v/v) FCS (Biochrom); 10 % (v/v) DMSO

Zum Einfrieren wurden  $1 \times 10^6$  Zellen pelletiert, in 1 ml eiskaltem Einfriermedium aufgenommen, in Kryoröhrchen überführt und in einer mit Isopropanol gefüllten Kryobox auf -80° C gekühlt. Die Lagerung über längere Zeiträume erfolgte in flüssigem Stickstoff.



Das Auftauen erfolgte im 37° C Wasserbad bis kurz vor dem vollständigen flüssigen Zustand der Zellsuspension. Die Suspension wurde in vorgekühltes Medium überführt und für 5 min, 1000 rpm und 4° C zentrifugiert. Das Pellet wurde in dem Zellen entsprechenden Kulturmedium aufgenommen und ausgesät.

### 2.3.4 Liposomale Transfektion

Die Transfektion von Plasmid-DNA (Tab. 5) erfolgte mit *Lipofectamine 2000* (Invitrogen) nach Herstellerangaben. Für Melanomzellen wurde ein Verhältnis µg DNA zu µl *Lipofectamine 2000* von 1:5 verwendet, während die stabile HeLa Transfektanten mit einem Verhältnis von 1:0,5 transfiziert wurden. Nach 24-48 h wurden die Zellen weiterverwendet.

Zur Transfektion von siRNA (Tab. 6) wurde das *HighPerFect Reagent* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Zellen wurden für 48-72 h mit dem Transfektionsansatz inkubiert.

Tab. 5: Expressionskonstrukte

Insert	Vektor	Herkunft
Melan-A	pcDNA3.1 (Invitrogen)	
Melan-A.sol	pcDNA3.1 (Invitrogen)	
VIMP	pcDNA3.1 (Invitrogen)	
p97	pcDNA3.1 (Invitrogen)	T. Rapoport, Harvard University
p97 QQ	pcDNA3.1 (Invitrogen)	T. Rapoport, Harvard University
PA28α	pcDNA3.1 (Invitrogen)	U. Seifert, Charité-Universitätsmedizin Berlin
PA28β	pcDNA3.1 (Invitrogen)	U. Seifert, Charité-Universitätsmedizin Berlin

Tab. 6: siRNA

Name	Zielsequenz	Herkunft
HERPUD1	CGACAGUACUACACUGCAAU GGGCCACCGUUGUUAUGUA GGCUUCAGCUUCCUGGUU GCGGAUGAAUGCACAAGGU	Dharmacon
HRD1	UCAUCAAGGUUCUGCUGUAUU GAGAAGAGAUGGUGACUGGUU CAACAUGAACACCCUGUAUUU GGAAAGGCCUCCAGCUCCUUU	Dharmacon

---

Non-targeting siRNA		Dharmacon
Hs_SELS_2_HP (VIMP)	CTGGCGGATGAGGCTAAGAAT	Qiagen

---

### 2.3.5 Isolation von peripheren mononukleären Zellen (PBMC)

Zur Isolation von PBMC aus *Buffy Coats* (Lymphozytenkonzentrat) gesunder Donoren wurde das Konzentrat 1:1 mit RPMI-Medium ohne Zusätze verdünnt, in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit 12 ml Ficoll-Hypaque (Biochrom) unterschichtet. Mittels Dichtegradienten-Zentrifugation für 20 min bei 1800 rpm und RT mit auslaufender Zentrifuge wurden die zellulären Blutbestandteile aufgetrennt. Die Lymphozyten und Monozyten (PBMC) sammeln sich dabei entsprechend ihrer spezifischen Dichte in der Interphase zwischen Überstand (Plasma/Thrombozyten) und Ficoll-Hypaque an. Das Zellsediment bilden Erythrozyten und Granulozyten, die eine höhere Dichte besitzen. Der Interphasering wurde abgenommen, 3x mit RPMI-Medium ohne Zusätze gewaschen und mittels Zentrifugation für 10 min bei 1200 rpm und 4° C pelletiert. Zur Lagerung wurden die Zellen eingefroren (2.3.3).

### 2.3.6 Generierung von Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischen CTL

Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifische CTL wurden von Frédéric Ebstein (Charité-Universitätsmedizin Berlin) nach Fonteneau *et al.* generiert (Fonteneau *et al.*, 2001).

### 2.3.7 Amplifikation von CTL

AB-Medium: RPMI-Medium (Biochrom); 10 % humanes AB-Serum (PAA); 100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin

Zur Expansion von CTL wurden zunächst  $2 \times 10^6$  EBV-B Zellen bei 33 Gray und  $2 \times 10^7$  PBMC bei 13 Gray im  $\gamma$ -Strahler (STS GmbH) bestrahlt. Die Zellen wurden in RPMI-Medium für 10 min bei 1200 rpm und 4° C abzentrifugiert und zusammen in 10 ml AB-Medium resuspendiert (*Feeder*-Zellen). Es folgte die Aussaat von 100 µl Zellsuspension in eine 96-Well-Platte. Im Anschluss wurden  $2 \times 10^6$  CTL in RPMI-Medium gewaschen und in 5 ml AB-Medium resuspendiert, das mit 3 µg/ml L-PHA (Sigma) und 450 U/ml rhIL-2 (Chiron Therapeutics) versetzt wurde. 50 µl der Zellsuspension wurde zu den ausgesäten *Feeder*-Zellen pro Well hinzugegeben. Bei Bedarf wurden die Zellen passagiert, indem sie mit Hilfe einer Pipette 1:1 auf

neue 96-Well-Platten aufgeteilt und mit 450 U/ml rhIL-2 versetzten AB-Medium auf ein Volumen von 100 µl pro Well aufgefüllt wurden. Nach 14 Tagen wurden die CTL verwendet oder für eine längere Lagerung in FCS mit 10 % (v/v) DMSO bei -80° C eingefroren.

## 2.4 Immunologische Methoden

### 2.4.1 Immunpräzipitation von Proteinen

10x PBS: siehe 2.2.6

4x SDS-Probenpuffer: siehe 2.2.3

ProteinG-Sepharose 50 %: 50 % (w/v) ProteinG-Sepharose (GE Healthcare); 50 % (v/v) 1x PBS

Die Immunpräzipitation erfolgte aus Gesamtzelllysaten, die mit 1x PBS unter Zugabe von 20 µg/ml BSA auf 1 ml verdünnt wurden. Nach Zugabe des Antikörpers (Tab. 3, 2.2.6) wurden der Präzipitationsansatz ü.N. bei 4° C auf einem Rollator inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Inkubation mit ProteinG-Sepharose 50 % für 2 h bei 4° C auf einem Rollator. Anschließend wurden folgende Waschschrte durchgeführt: zweimaliges Waschen mit 2x PBS + 0,5 % (v/v) NP-40, einmaliges Waschen mit 1x PBS und finales Waschen mit MilliQ H<sub>2</sub>O. Die Pelletierung der Sepharose wurde durch Zentrifugation für 2 min bei 3000 rpm vorgenommen. Überschüssiges Wasser wurde mit einer Kanüle abgenommen und die Sepharose wurde in 1x Probenpuffer aufgenommen, bei 95° C für 5 min inkubiert und im Anschluss zur SDS-PAGE auf ein Gel aufgetragen.

### 2.4.2 Durchflusscytometrie – *Fluorescence activated cell-sorting* (FACS)

FACS-Puffer: 1x PBS; 1 % (w/v) BSA; 0,1 % (w/v) NaN<sub>3</sub>

Es wurden pro Ansatz 2x10<sup>5</sup> Zellen ausgesät und mit FACS-Puffer für 5 min bei 1000 rpm und 4° C gewaschen. Die Zellen wurden mit primärem Antikörper (Tab. 7) versetzten FACS-Puffer resuspendiert und für 30 min bei 4° C inkubiert. Es folgte das zweimalige Waschen mit FACS-Puffer und die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 30 min bei 4° C. Nach weiterem zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Ansätze in 150 µl FACS-Puffer resuspendiert und die Fluoreszenz am FACSCalibur (BD Biosciences) gemessen.

Tab. 7: FACS-Antikörper

Name	Verdünnung	Herkunft
anti-Melan-A	1:250	Novocastra
anti-HLA-A*0201	1:250	BD Biosciences
anti-MausIgG FITC	1:250	BD Biosciences

### 2.4.3 Antigenpräsentationsanalyse (CTL Assay)

Mit Hilfe von Antigenpräsentationsanalysen über die Sekretion von TNF- $\alpha$  kann die Antigenerkennung von CTL gegenüber antigenpräsentierenden Zielzellen gemessen werden. Die Zielzellen wurden geerntet, mit RPMI-Medium oder BASAL ISCOVE-Medium entsprechend der Zellkultivierungsbedingungen der jeweiligen Zelllinie (2.3.1) gewaschen und  $4 \times 10^5$  Zellen pro Well einer 96-Well-Platte ausgesät. Es folgten serielle Verdünnungen der Zielzellen. Zur Kontrolle der Spezifität der eingesetzten CTL wurden Zielzellen zusätzlich vor der Aussaat für 1 h mit 5  $\mu\text{g/ml}$  Melan-A<sub>26-35</sub>-Peptide auf Eis inkubiert. Die CTL wurden mit RPMI-Medium gewaschen, in dem den Zielzellen entsprechenden Kulturmedium resuspendiert und  $4 \times 10^5$  Zellen zu den mit Zielzellen beladenen Wells ausgesät. Die Zellen wurden für 6 h im Begasungsbrutschrank (2.3.1) inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 3 min bei 1500 rpm und 4° C abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und bei -80° C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Quantifizierung der TNF- $\alpha$ -Konzentrationen der Überstände erfolgte mit dem *BD OptEIA™ Human TNF Set* (BD Biosciences) nach Herstellerangaben. Die Überstände wurden 1:5 verdünnt.

### 2.4.4 Cytotoxizitätsassay (*<sup>51</sup>Cr release assay*)

Mit Hilfe des Cytotoxizitätsassay lässt sich quantifizieren, wie effizient CTL Zielzellen cytolysieren können. Das Prinzip dieser Methode basiert auf der Aufnahme von <sup>51</sup>Cr durch Zielzellen und der späteren Lyse der Zellen durch CTL. Die  $\gamma$ -Strahlung des in den Überstand freigesetzten <sup>51</sup>Cr kann anschließend gemessen werden.

$2 \times 10^5$  Zielzellen wurden in 100  $\mu\text{l}$  den Zellkulturbedingungen der Zellen entsprechenden Medium (2.3.1) unter Zugabe von 50  $\mu\text{Ci}$  <sup>51</sup>Cr (PerkinElmer) für 2 h bei 37° C in einem Begasungsbrutschrank inkubiert (2.3.1). Bei exogener Beladung von MHC Klasse I Molekülen von Zielzellen wurde zusätzlich 5  $\mu\text{g/ml}$  Melan-A<sub>26-35</sub>-Peptid hinzugegeben. Im Anschluss wurden die Zellen dreimalig gewaschen (5 min, 1200 rpm, 4° C) und jeweils 2000 Zielzellen pro Well einer 96-Well-Platte ausgesät. Die CTL wurden wie in 2.4.3 gewaschen und in einem Verhältnis von 5:1, 10:1 und 20:1 zu den Zielzellen hinzugegeben, so dass das Volumen pro Well

200 µl betrug. Zur Messung der spontanen Lyse wurde anstatt CTL die Wells lediglich mit Medium auf 200 µl aufgefüllt, während zur Quantifizierung der maximalen Lyse 1 % Triton-X hinzugefügt wurde. Die Zellen wurden für 4 h in einem Begasungsbrutschrank bei 37° C inkubiert. Danach wurden die Zellen für 2 min bei 2000 rpm und 4° C zentrifugiert und jeweils 100 µl Medium aus den Wells in Messröhrchen überführt und anschließend in einem γ-Counter (Cobra Packard) vermessen.

Berechnung der spezifischen Lyse in %:

$$\text{spezifische Lyse [\%]} = [(\text{spezifische Lyse} - \text{spontane Lyse}) / (\text{maximale Lyse} - \text{spontane Lyse})] \times 100 \%$$

#### 2.4.5 Immunselektion von Melanomzellen

Zur Selektion von Mel 15-Zellen, die resistent gegenüber der Cytotoxizität Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischer CTL (Klon 10) sind (2.3.2), wurden Mel 15-Zellen in einem Verhältnis von 1:50 mit Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischen CTL in einem Well einer 6-Well-Platte ausgesät, und für 5 h bei 37° C in einem Begasungsbrutschrank (2.3.1) inkubiert. Im Anschluss wurden die Mel 15-Zellen dreimalig mit 1x PBS gewaschen und weiter in RPMI Medium kultiviert (2.3.1). Nach zwei Wochen wurden die überlebenden Mel 15-Zellen erneut unter den gleichen Bedingungen mit Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischen CTL inkubiert und im Anschluss gewaschen. Die überlebenden Zellen des zweiten Selektionsschrittes wurden mittels *Limiting Dilution* von 0,3 Zellen pro Well in einer 96-Well-Platte, vereinzelt und klonal expandiert.

### 3 ERGEBNISSE

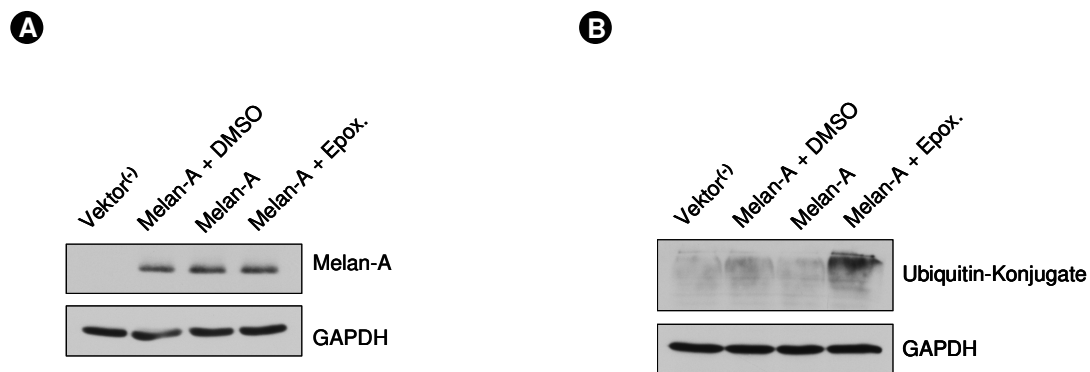
#### 3.1 Untersuchung der proteasomalen Generierung von Melan-A<sub>26-35</sub>

Das Proteasom generiert die meisten Epitope, die im Kontext mit MHC Klasse I Molekülen cytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) präsentiert werden. In diesem Zusammenhang wurde untersucht, ob die Generierung und folglich die Präsentation des Melanom-assoziierten HLA-A\*0201-restringierten Epitops Melan-A<sub>26-35</sub> durch das Proteasom determiniert ist. Es wurden Melanomzellen (Mel 91) mit dem Proteasominhibitor Epoxomicin behandelt, um eine potenzielle Korrelation der proteasomalen Inhibition und der Präsentation des Epitops Melan-A<sub>26-35</sub> zu detektieren.

Die Untersuchung der Epitopräsentation erfolgte durch Antigenpräsentationsanalysen (CTL-Assays). Dabei wurde die Qualität und Quantität der Epitoperkennung über die Menge des durch Epitop-spezifische CTL freigesetzten TNF- $\alpha$  gemessen. Mel 91-Zellen, die keine endogene Expression von Melan-A aufweisen (Melan-A<sup>(-)</sup>), wurden transient mit einem Vektor kodierend für Melan-A transfiziert und entweder mit oder ohne Epoxomicin kultiviert.

In den Zellen wurde die Expression von Melan-A mittels Immunoblotanalysen untersucht, die äquivalente Mengen des Proteins in der An- oder Abwesenheit des Inhibitors aufwiesen (**Abb. 8A**). Zur Verifikation der Inhibition von Proteasomen durch Epoxomicin wurden Ubiquitin-Konjugate (polyubiquitinierte Proteine) über Immunoblotanalysen nachgewiesen (**Abb. 8B**). Epoxomicin exponierte Zellen wiesen eine deutliche Akkumulation von Ubiquitin-Konjugaten im Vergleich zu unbehandelten Zellen auf, was auf eine effiziente Inhibition des Proteasom hinweist.

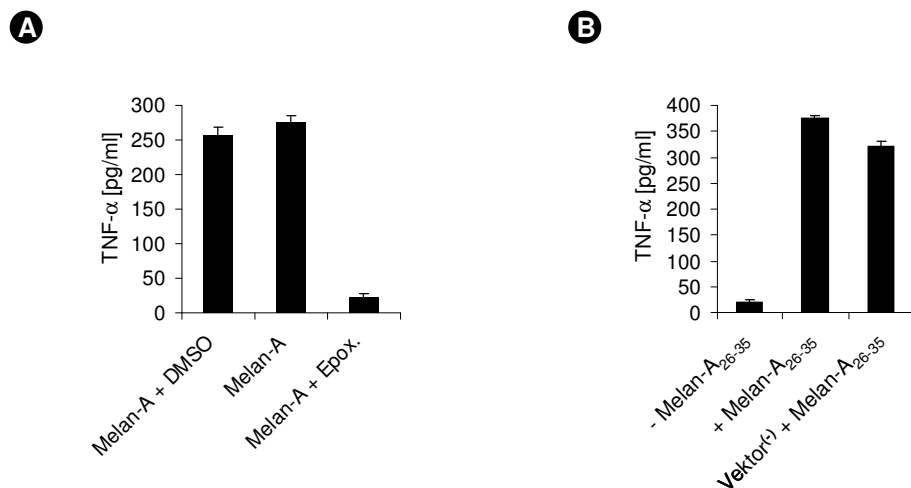
Da Melan-A sowohl lysosomal als auch proteasomal degradiert wird (siehe 1.4), könnte der Kontrast zwischen der Akkumulation von Ubiquitin-Konjugaten und der nicht detektierbaren Stabilisierung von Melan-A in Epoxomicin-exponierten Zellen in der Dominanz des lysosomalen über den proteasomalen Abbaus von Melan-A in Melanomzellen begründet sein (Levy *et al.*, 2005). Die Mengen des Proteins, die über das Proteasom abgebaut wurden, könnten demnach zu gering gewesen sein, um einen Unterschied nach Inhibition des Proteasoms über Immunoblotanalysen nachzuweisen.



**Abb. 8: Expressionskontrollen von Melan-A und Verifikation der Inhibition von Proteasomen.** Mel 91-Zellen wurden entweder mit einem Vektor kodierend für Melan-A oder einem nicht kodierenden Vektor (Vektor<sup>(-)</sup>) entsprechend den Angaben transfiziert. Epoxomicin exponierte Zellen wurden für 4 h mit 1  $\mu$ M Epoxomicin behandelt. DMSO diente als Kontrolle des Epoxomicinlösungsmittels. **(A)** Immunoblotanalysen zur Detektion von Melan-A und GAPDH als Ladekontrolle der Mel 91-Zellen. **(B)** Detektion von Ubiquitin-Konjugaten mittels Immunoblotanalysen.

Die Auswirkung der Proteasominhibition auf die Präsentation des Epitops Melan-A<sub>26-35</sub> wurde mittels Antigenpräsentationsanalysen mit Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischen CTL untersucht (**Abb. 9**). Mel 91-Zellen, die mit Epoxomicin kultiviert wurden, wiesen eine drastisch verminderte Präsentation des Epitops auf (**Abb. 9A**). Mögliche Folgen der Transfektion auf die HLA-A\*0201 Expression wurden durch die Transfektion eines nicht kodierenden Vektors (Vektor<sup>(-)</sup>) und der Gegenwart von exogen dazugegebenen Melan-A<sub>26-35</sub>-Peptiden ausgeschlossen (**Abb. 9B**). Die Zugabe exogener Melan-A<sub>26-35</sub>-Peptide im Überschuss induziert durch Bindung an nicht mit Peptiden komplexierten MHC Klasse I Molekülen der Zelloberfläche deren Stabilisierung. Sie dient dadurch als Maß für Veränderungen der MHC Klasse I Expression. Mel 91-Zellen, die mit Vektor<sup>(-)</sup> transfiziert wurden, zeigten im Vergleich mit natürlichen Mel-91-Zellen in Anwesenheit von exogenen Melan-A<sub>26-35</sub>-Peptiden keine Unterschiede in der Erkennung durch Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischen CTL. Die Expression von HLA-A\*0201 Molekülen war demnach durch die Transfektion nicht beeinflusst und trug daher nicht zur Reduktion der CTL-Erkennung Epoxomicin behandelter Zellen bei. (**Abb. 9A, B**).

Die Präsentation bzw. Generierung des Epitops Melan-A<sub>26-35</sub> ist in Folge dessen Proteasom-abhängig.



**Abb. 9: Antigenpräsentationsanalyse von Melan-A<sub>26-35</sub> mit und ohne Epoxomicin-Exposition.** Die Erkennung der verwendeten Mel 91-Zellen durch Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifische CTL wurde über die Sekretion des Cytokins TNF- $\alpha$  gemessen. E:T=1:1. **(A)** Mel 91-Zellen wurden transient mit einem Vektor kodierend für Melan-A transfiziert und entweder mit Epoxomicin (4 h), DMSO (als Lösungsmittelkontrolle des Inhibitors, 4 h) oder nicht weiter behandelt. **(B)** Die Spezifität der eingesetzten Melan-A<sub>26-35</sub>-restringierten CTL wurde durch die exogene Zugabe von Melan-A<sub>26-35</sub>-Peptiden bzw. deren Abwesenheit verifiziert. Zur Kontrolle der HLA-A\*0201 Expression wurden Mel 91 transient mit einem nicht kodierenden Vektor (Vektor<sup>-</sup>) transfiziert und die CTL-Erkennung in der Präsenz von exogen dazugegebenen Melan-A<sub>26-35</sub>-Peptiden analysiert.

### 3.2 Modulation der Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> durch Proteasomsubtypen

Die effiziente Generierung von Epitopen durch Proteasomen basiert auf der spezifischen Zusammensetzung und Kooperation katalytischer Untereinheiten, die das katalytische Profil determinieren. INF $\gamma$ , ein proinflammatorisches antitumorales Cytokin, induziert die Expression von Komponenten der Antigenprozessierungsmaschinerie, die zur Assemblierung von Immunoproteasomen und intermediären Proteasomsubtypen führt. Diese unterscheiden sich sowohl untereinander als auch im Vergleich zu Standardproteasomen in den Kombinationen katalytischer konstitutiver Untereinheiten und Immununtereinheiten. Auch die Expression des Proteasomaktivators PA28 wird durch INF $\gamma$  induziert. Dessen Assoziation mit Proteasomen kann die Effizienz der Epitopgenerierung wesentlich beeinflussen, indem beispielsweise die Generierung spezifischer Epitope verstärkt wird (siehe 1.2.1).

Zur Analyse der Prozessierung von Melan-A<sub>26-35</sub> durch verschiedene Proteasomsubtypen inklusive PA28 assoziierter Proteasomen wurden zwei komplementäre Methoden genutzt. Es wurde zum einen die Präsentation des Epitops in zellulären Systemen untersucht, die entweder Standard-, Immunoproteasomen oder diverse intermediäre Proteasomsubtypen exprimieren und zum anderen die *in vitro* Prozessierung eines synthetischen Melan-A<sub>26-35</sub>-beinhaltenden



Modellsubstrats durch isolierte Proteasomen der verschiedenen Subtypen analysiert. Die Sequenz des Epitops Melan-A<sub>26-35</sub> beinhaltet neben dem 10mer Epitop ebenfalls die des 9mers Melan-A<sub>27-35</sub>. Aufgrund der exklusiven Verfügbarkeit von Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischen CTL, deren Erkennung gegenüber dem 9mer Epitop extrem reduziert ist (Daten nicht gezeigt), lag der Fokus der Untersuchungen auf der Prozessierung des 10mer Epitops Melan-A<sub>26-35</sub>.

### 3.2.1 Die Degradation von Melan-A mit und ohne INF $\gamma$ -Exposition

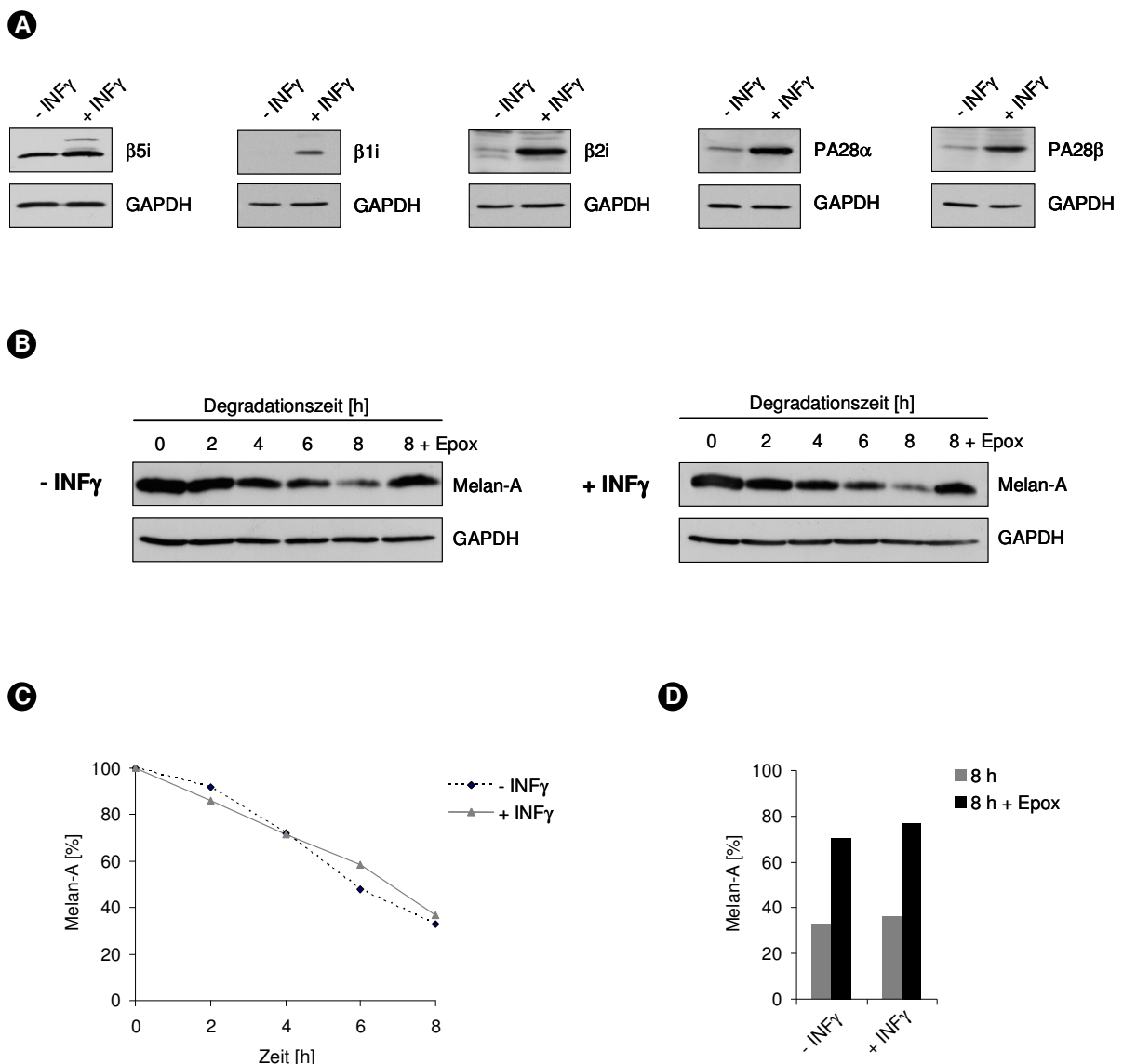
Da nach der Stimulation mit INF $\gamma$  die Präsentation des Epitops Melan-A<sub>26-35</sub> in Melan-A exprimierenden Zellen drastisch reduziert ist (Morel *et al.*, 2000), wurde untersucht, ob die Degradation von Melan-A durch INF $\gamma$ -induzierbare Faktoren vermindert wird. Basierend auf der Abhängigkeit der Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> vom Proteasom könnte die INF $\gamma$ -induzierte Expression der Immununtereinheiten und von PA28 einen negativen Einfluss auf die proteasomale Degradation von Melan-A ausüben. Einen inhibierten Abbau von Melan-A durch INF $\gamma$ -induzierte Proteasomsubtypen könnte die Menge von Melan-A<sub>26-35</sub>-Peptiden deutlich reduzieren, die für eine effiziente Präsentation des Epitops *in vivo* nötig ist.

Zur Analyse eines potenziellen inhibierten Abbaus von Melan-A in Gegenwart von INF $\gamma$  wurden HeLa-Zellen aufgrund ihrer fehlenden Melan-A Expression transient mit einem Vektor kodierend für Melan-A transfiziert und die Degradation des Proteins in der An- und Abwesenheit von INF $\gamma$  durch Inhibition der Translation mittels Cycloheximid untersucht. Die Degradation von Melan-A wurde durch die Lyse der Zellen nach verschiedenen Zeitpunkten der Zugabe von Cycloheximid und anschließende Immunoblotanalysen ermittelt. Aufgrund der lysosomalen und proteasomalen Degradation des Proteins Melan-A wurden zur Quantifizierung des proteasomalen Abbaus INF $\gamma$  stimulierte und unstimulierte HeLa-Zellen zusätzlich für 8 h in Anwesenheit des Proteasominhibitors Epoxomicin kultiviert.

Die Induktion der Expression der Immununtereinheiten  $\beta$ 1i,  $\beta$ 2i und  $\beta$ 5i und der PA28-Untereinheiten PA28 $\alpha$  und PA28 $\beta$  nach INF $\gamma$  Stimulation der HeLa-Zellen wurde mittels Immunoblotanalysen verifiziert (**Abb. 10A**). Es zeigte sich eine deutliche Induktion der Expression der drei Immununtereinheiten und von PA28 $\alpha$  und PA28 $\beta$  nach Behandlung der Zellen mit INF $\gamma$ .

Die Immunoblotanalysen von Melan-A INF $\gamma$  stimulierter und unstimulierter HeLa-Zellen demonstrierten einen äquivalenten Abbau von Melan-A über die Zeit (**Abb. 10B**). Durch die Inhibition des Proteasom durch Epoxomicin wurde der Abbau deutlich inhibiert. In

Übereinstimmung zeigten die densitometrischen Auswertungen der Gelbanden eine gleiche Degradationseffizienz von Melan-A in An- und Abwesenheit von  $\text{INF}\gamma$  mit einer Halbwertszeit von ca. 7 h (**Abb. 10C**). In **Abb. 10D** sind die densitometrischen Auswertungen des 8 h Wertes von  $\text{INF}\gamma$  stimulierten und unstimulierten HeLa-Zellen in An- und Abwesenheit von Epoxomicin gegenübergestellt. Die Inhibition des Proteasoms führte unabhängig von einer  $\text{INF}\gamma$ -Exposition der HeLa-Zellen zu einer Stabilisierung von Melan-A um ca. 55 %. Folglich wurden äquivalente Mengen von Melan-A über das Proteasom abgebaut.



**Abb. 10: Analyse der Degradation von Melan-A in der An- und Abwesenheit von  $\text{INF}\gamma$ .** HeLa-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von  $\text{INF}\gamma$  (200 U/ml, 24 h) kultiviert. **(A)** Immunoblotanalyses zum Nachweis von  $\beta 5i$ ,  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$ , PA28 $\alpha$  und PA28 $\beta$ . **(B)** Immunoblotanalyses zum Nachweis von Melan-A zu den angegebenen Zeitpunkten nach Zugabe des Translationsinhibitors Cycloheximid. Zusätzlich wurden Zellen mit dem Proteasominhibitor Epoxomicin behandelt. **(C)** Densitometrische Analysen der im Zeitverlauf detektierten Proteinbanden von Melan-A der Immunoblotanalyses aus (B). **(D)** Densitometrische Analyse der Proteasom-vermittelten Degradation von Melan-A bei gleichzeitiger Inhibition des Proteasoms und Hemmung der Translation.

Während in Mel 91-Zellen durch die Inhibition des Proteasoms keine sichtbare Stabilisierung von Melan-A zu detektieren war (siehe **Abb. 8**, 3.1), wiesen HeLa-Zellen unter den gleichen Bedingungen eine Stabilisierung von mehr als 50 % auf. Der Unterschied zwischen der Proteasom-vermittelten Degradation von Melan-A in Mel 91- und HeLa-Zellen könnte in dem Fehlen von Melanosomen in HeLa-Zellen begründet sein, was den natürlichen sekretorischen Weg von Melan-A stören und zu einer Dominanz des proteasomalen Abbaus führen könnte.

Der vergleichbare Abbau von Melan-A in An- und Abwesenheit des Cytokins INF $\gamma$  und das Überwiegen des proteasomalen Abbaus (>50 %) zeigt, dass weder die Expression von Immununtereinheiten und PA28 noch weitere INF $\gamma$ -induzierbare Faktoren einen Einfluss auf den Abbau von Melan-A haben.

### **3.2.2 Die Modulation der Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> durch Immununtereinheiten**

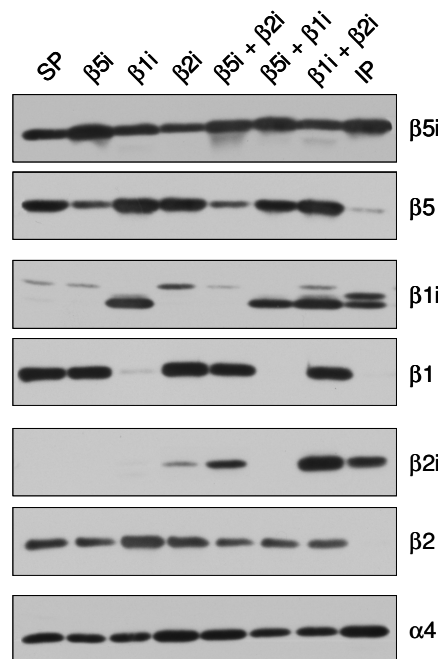
INF $\gamma$  induziert nicht nur die Expression von Immunoproteasomen, intermediären Proteasomsubtypen und PA28, sondern verändert die zelluläre Physiologie durch multiple Prozesse, wie beispielsweise die vermehrte Expression von MHC Klasse I Molekülen und TAP-Untereinheiten, die einen Einfluss auf die Effizienz der Präsentation von Epitopen ausüben können. Zum Ausschluss INF $\gamma$ -induzierter Effekte auf die Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub>, die nicht auf der Induktion spezifischer Proteasomsubtypen basieren, wurden HeLa-Zelllinien genutzt, die durch Transfektion entsprechender Plasmidkonstrukte stabil Immununtereinheiten in verschiedenen Kombinationen exprimieren und in Folge dessen verschiedene Proteasomsubtypen ausbilden.

#### **3.2.2.1 Einfluss von Immununtereinheiten auf die Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub>**

Die Rolle von Standard- (SP), Immunoproteasomen (IP) und intermediären Proteasomsubtypen (IMP) auf die Präsentation des Epitops Melan-A<sub>26-35</sub> wurde mit Hilfe von HeLa-Zelllinien untersucht, die HLA-A\*0201 (HeLa<sup>HLA</sup>) sowie zusätzlich diverse Kombinationen der Immununtereinheiten  $\beta$ 1i,  $\beta$ 2i und  $\beta$ 5i stabil exprimieren (HeLa-Transfektanten). Während HeLa<sup>HLA</sup>-Zellen *per se* überwiegend SP exprimieren, wurden durch die jeweiligen Transfektionen HeLa<sup>HLA</sup>-Zelllinien etabliert, deren Proteasompopulationen einen dominanten Anteil

verschiedener intermediärer Proteasomsubtypen ( $\text{IMP}^{\beta 5i}$ ,  $\text{IMP}^{\beta 1i}$ ,  $\text{IMP}^{\beta 2i}$ ,  $\text{IMP}^{\beta 5i+\beta 1i}$ ,  $\text{IMP}^{\beta 5i+\beta 2i}$ ,  $\text{IMP}^{\beta 1i+\beta 2i}$ ) oder Immunoproteasomen enthalten.

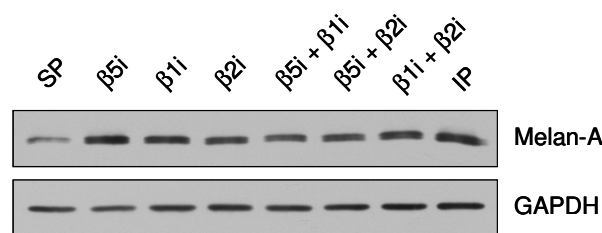
Der Einbau exprimierter Immununtereinheiten in die Proteasomen der  $\text{HeLa}^{\text{HLA}}$ -Zelllinien wurde über die Isolation von 20S Proteasomen der Zelllinien und anschließenden Immunoblotanalysen untersucht (**Abb. 11**). Als Indiz für die Effizienz der Inkorporation der Immununtereinheiten dient die Reduktion des Einbaus der korrespondierenden konstitutiven Untereinheiten. Die  $\text{HeLa}^{\text{HLA}}$ -Zelllinien wiesen bereits *per se* einen basalen Einbau von  $\beta 5i$  auf, der jedoch in Proteasomen des Typs  $\text{IMP}^{\beta 5i}$ ,  $\text{IMP}^{\beta 5i+\beta 1i}$ ,  $\text{IMP}^{\beta 5i+\beta 2i}$  und IP deutlich, *vice versa* des Einbaus von  $\beta 5$ , gesteigert war. Der Einbau von  $\beta 1i$  erfolgte sehr effizient in  $\text{IMP}^{\beta 1i}$ ,  $\text{IMP}^{\beta 5i+\beta 1i}$  und IP mit Ausnahme von Proteasomen des Typs  $\text{IMP}^{\beta 1i+\beta 2i}$ , die zwar eine deutliche Inkorporation von  $\beta 1i$  aufwiesen, aber gleichfalls der konstitutiven Untereinheit  $\beta 1$ . Der vergleichbare Einbau beider Untereinheiten deutet auf eine nicht vollständige Inkorporation von  $\beta 1i$  in beide Hemisphären des Proteasoms hin. Der Einbau von  $\beta 2i$  in IP demonstriert aufgrund der nicht detektierbaren konstitutiven Untereinheit  $\beta 2$  des Proteasomsubtyps eine effiziente Inkorporation der Immununtereinheit. Proteasomen des Typs  $\text{IMP}^{\beta 2i}$ ,  $\text{IMP}^{\beta 5i+\beta 2i}$ ,  $\text{IMP}^{\beta 1i+\beta 2i}$  wiesen sowohl einen Einbau der Immununtereinheit  $\beta 2i$  als auch der konstitutiven Untereinheit  $\beta 2$  auf, allerdings wurde bei  $\text{IMP}^{\beta 2i}$   $\beta 2$  in nur sehr geringen Mengen detektiert.



**Abb. 11: Der Einbau von Immununtereinheiten in Proteasomen der HeLa-Transfektanten.** Immunoblotanalysen der isolierten 20S Proteasomen aus den etablierten  $\text{HeLa}^{\text{HLA}}$ -Zelllinien mittels Antikörpern gerichtet gegen einzelne konstitutive Untereinheiten und Immununtereinheiten. Als Ladekontrolle wurde die Untereinheit  $\alpha 4$  nachgewiesen.

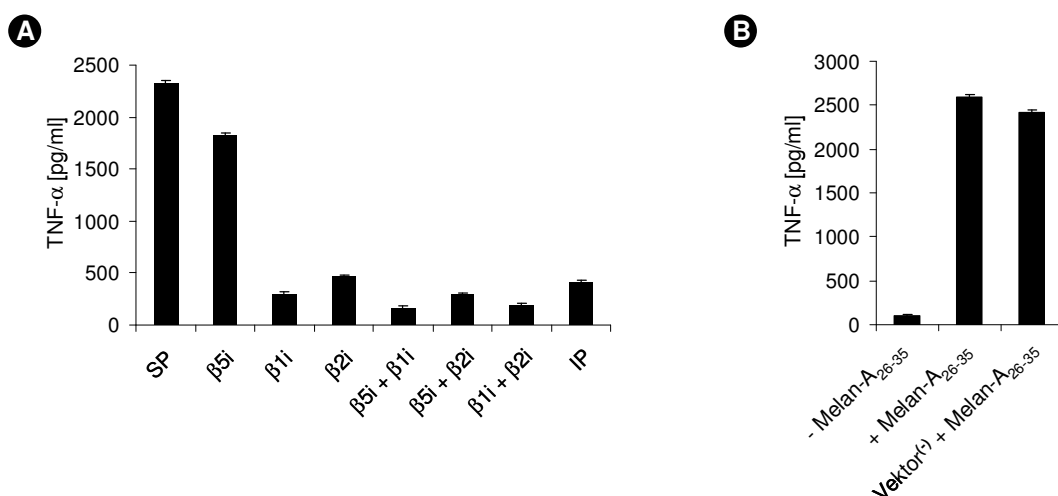
Die isolierten 20S Proteasomen der HeLa<sup>HLA</sup>-Zelllinien zeigten einen deutlichen Einbau der jeweiligen transfizierten Immununtereinheiten.

Aufgrund der fehlenden endogenen Expression von Melan-A in HeLa-Zellen wurde die HeLa-Transfektanten transient mit einem Vektor kodierend für Melan-A transfiziert und die Expression des Proteins mittels Immunoblotanalysen kontrolliert (**Abb. 12**). Es wurde eine gleichmäßige Expression von Melan-A, mit Ausnahme von SP exprimierenden HeLa<sup>HLA</sup>-Zellen, in den transfizierten Zelllinien detektiert.



**Abb. 12: Expression von Melan-A in HeLa-Transfektanten.** Immunoblotanalysen der mit einem Vektor kodierend für Melan-A transient transfizierten HeLa-Transfektanten zum Nachweis von Melan-A.

Die Untersuchung der Epitopräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> der verschiedenen HeLa-Transfektanten erfolgte über ein CTL-Assay mit Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischen CTL (**Abb. 13**). Das Niveau der Epitopräsentation von IMP<sup>β5i</sup> exprimierenden Zellen war in Relation zu Zellen mit SP um ca. 25 % reduziert. Zellen, deren Proteasomen β1i und/oder β2i enthalten (IMP<sup>β1i</sup>, IMP<sup>β2i</sup>, IMP<sup>β5i+β1i</sup>, IMP<sup>β5i+β2i</sup>, IMP<sup>β1i+β2i</sup>, IP), wiesen im Vergleich zu SP exprimierenden Zellen dagegen eine Reduktion der Erkennung durch Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifische CTL um mehr als 80 % auf.



**Abb. 13: Einfluss der Immununtereinheiten auf die Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub>.** CTL-Assay der HeLa-Transfektanten mit Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischen CTL. **(A)** Die etablierten HeLa-Transfektanten wurden transient mit einem Vektor kodierend für Melan-A transfiziert. **(B)** Kontrolle der Spezifität der Melan-A<sub>26-35</sub>-restringierten CTL durch exogene Beladung von HLA-A\*0201 Molekülen SP exprimierender HeLa-Transfektanten mit Melan-A<sub>26-35</sub>-Peptiden und zusätzlicher transients Transfektion von Vektor<sup>(-)</sup> als Transfektionskontrolle.

Entgegen der niedrigen Expression von Melan-A in SP exprimierenden Zellen zeigte deren CTL-Erkennung eine effiziente Präsentation des Epitops Melan-A<sub>26-35</sub>. Die Expression von Melan-A war demnach weder limitierend für die Antigenpräsentation des Epitops, noch führte eine höhere Expression des Proteins der übrigen HeLa-Transfektanten zu einer effizienten Epitoppräsentation.

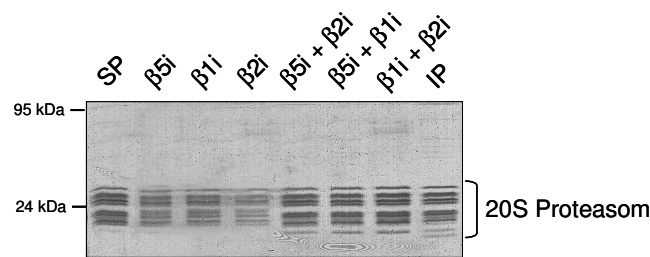
Die vergleichbare Reduktion der Antigenpräsentation  $\beta$ 1i und/oder  $\beta$ 2i exprimierender HeLa-Transfektanten weist, ungeachtet unterschiedlicher Effizienzen des Einbaus, auf einen dominant negativen Einfluss der Immununtereinheiten  $\beta$ 1i und  $\beta$ 2i auf die Epitoppräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub>. Ebenfalls bewirkt der Einbau von  $\beta$ 5i eine Reduktion der Präsentationseffizienz des Epitops, der jedoch im Vergleich zu  $\beta$ 1i und  $\beta$ 2i die Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> in sehr viel geringerer Intensität negativ beeinflusst.

### 3.2.2.2 Einfluss von Immununtereinheiten auf die Generierung von Melan-A<sub>26-35</sub>

Zur Identifizierung und Charakterisierung katalytischer Mechanismen der verschiedenen Proteasomsubtypen, die mit der Generierung des Epitops Melan-A<sub>26-35</sub> korrelieren, wurden *in vitro* Prozessierungsexperimente durchgeführt. Sie basieren auf der Degradation des synthetischen Modellsubstrats Melan-A<sub>15-40</sub>, das das Epitop und die flankierenden N- und C-terminalen Sequenzen beinhaltet, durch isolierte 20S Proteasomen. Die Degradations- bzw. Prozessierungsprodukte der Proteasomsubtypen wurden mittels *high performance liquid chromatography* (HPLC) aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert.

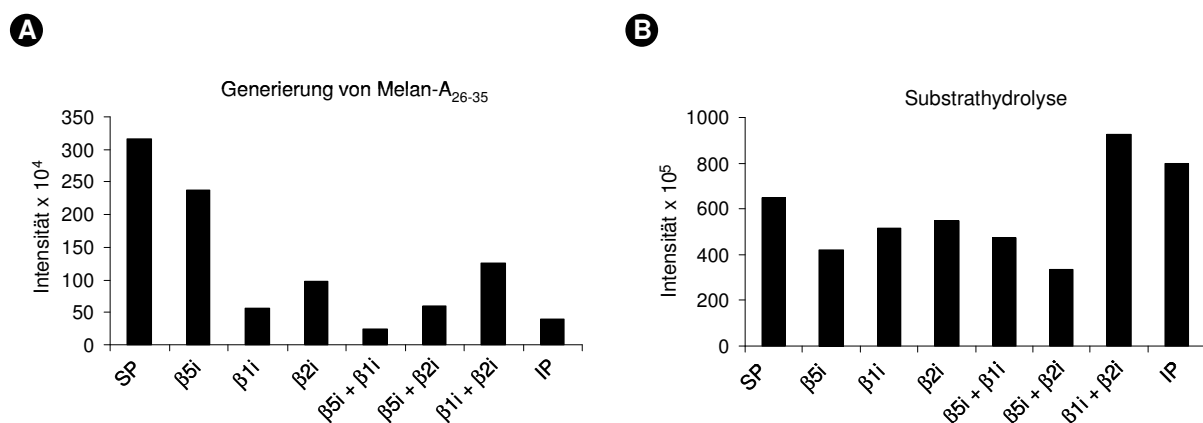
Für die *in vitro* Prozessierungsexperimente wurden 20S Proteasomen aus den verwendeten HeLa<sup>HLA</sup>-Zelllinien, die Standard-, Immunoproteasomen sowie die verschiedenen intermediären Proteasomsubtypen exprimieren, isoliert (siehe **Abb. 11**, 3.2.2.1).

Die isolierten Proteasomen wurden auf mögliche Kontamination mit anderen Proteinen analysiert, um einen Einfluss nicht-proteasomaler Proteasen auf die Degradation des Modellsubstrats auszuschließen. Dafür wurden die isolierten Proteasomen über ein Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Coomassie-Färbung detektiert (**Abb. 14**). Neben den proteasomalen Banden wurden keine weiteren Anreicherungen sichtbar.



**Abb. 14: Analyse isolierter Proteasomsubtypen auf Kontaminationen.** Untersuchung isolierter Proteasomsubtypen auf potenzielle Kontamination mit Proteinen durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung.

Die Generierung von Melan-A<sub>26-35</sub> durch die verschiedenen isolierten Proteasomsubtypen wurde durch die Degradation des synthetischen Modellsubstrats Melan-A<sub>15-40</sub> analysiert. Die Untersuchung erfolgte über die Identifikation und Quantifizierung der proteasomalen Degradationsprodukte. SP wiesen eine effiziente Generierung des Epitops auf, während die Generierungseffizienz bei IMP<sup>β5i</sup> um 30 % und durch Proteasomen des Typus IMP<sup>β1i</sup>, IMP<sup>β2i</sup>, IMP<sup>β5i+β1i</sup>, IMP<sup>β5i+β2i</sup>, IMP<sup>β1i+β2i</sup>, IP zwischen 60 % und 90 % reduziert war (**Abb. 15A**). Die Effizienz der Generierung des Epitops Melan-A<sub>26-35</sub> durch die verschiedenen Proteasomsubtypen entsprach weitgehend der Präsentationseffizienz des Epitops in Zellen, die den korrespondierenden Proteasomsubtyp exprimieren (siehe **Abb. 13**, 3.2.2.1).



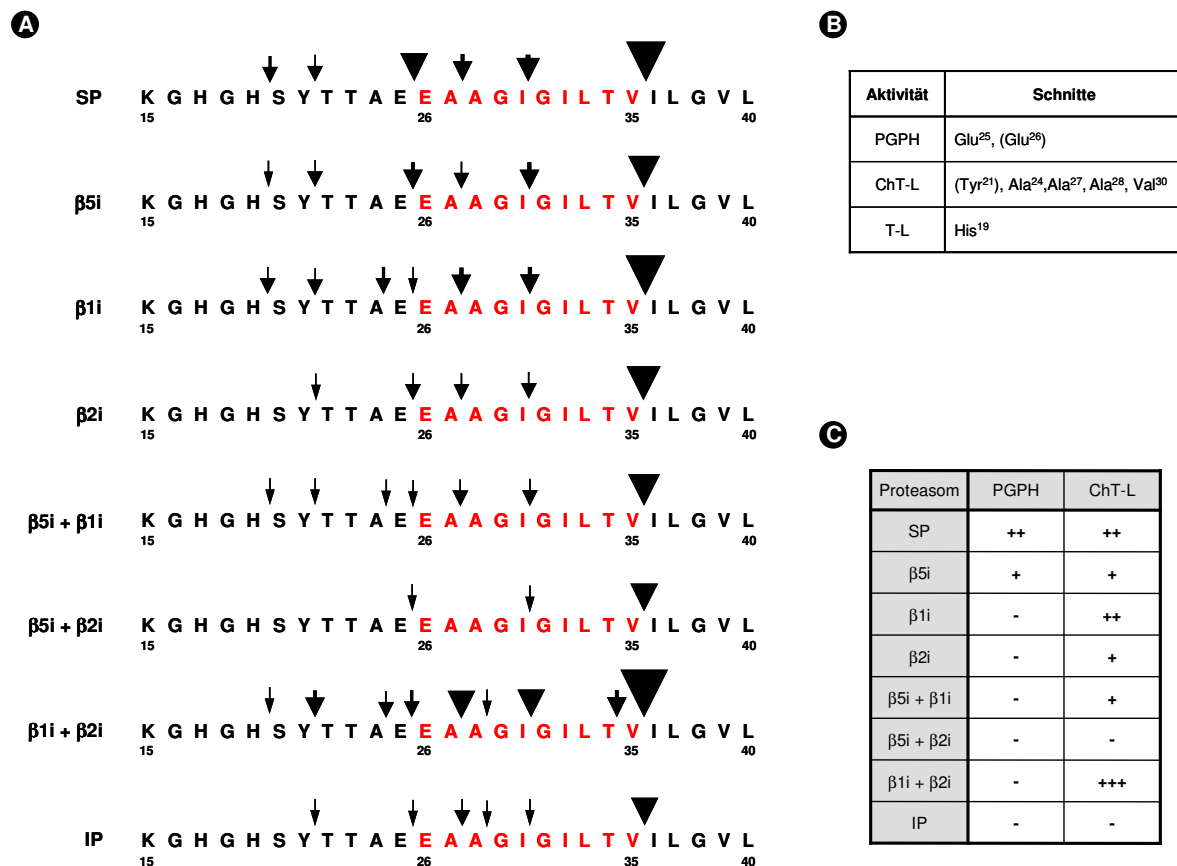
**Abb. 15: In vitro Generierung von Melan-A<sub>26-35</sub> und Rate der Hydrolyse des Modellsubstrats.** (A) Analyse der Generierung von Melan-A<sub>26-35</sub> durch die angegebenen Proteasomsubtypen nach 4 h Degradationszeit des Modellsubstrats Melan-A<sub>15-40</sub>. (B) Die Rate der Hydrolyse des Modellsubstrats der angegebenen Proteasomsubtypen nach 4 h Degradationszeit wurde über die Gesamtmenge neu produzierter Fragmenten gemessen.

Die Rate der Hydrolyse des Modellsubstrats Melan-A<sub>15-40</sub> wurde über die Gesamtmenge der generierten Degradationsfragmente ermittelt (Cascio *et al.*, 2002; Toes *et al.*, 2001) und zeigte in Relation zu SP mit Ausnahme von IMP<sup>β1i+β2i</sup> und IP eine erniedrigte Hydrolyserate der Proteasomsubtypen (**Abb. 15B**). Insbesondere IMP<sup>β5i</sup>, IMP<sup>β5i+β1i</sup> und IMP<sup>β5i+β2i</sup> zeigten eine

deutlich niedrigere Rate der Substrathydrolyse als SP. Im Gegensatz dazu war die Substrathydrolyserate bei  $\text{IMP}^{\beta 1i+\beta 2i}$  und IP verglichen mit SP deutlich gesteigert.

Durch die Immununtereinheiten  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  und  $\beta 5i$  kommt es zu einer ineffizienten Generierung des Epitops Melan-A<sub>26-35</sub>, die besonders durch  $\beta 1i$  und  $\beta 2i$  massiv negativ beeinflusst ist. Basierend auf den Substrathydrolyseraten der Proteasomsubtypen steht die ineffiziente Generierung des Epitops nicht in einem direkten Zusammenhang mit einer erniedrigten Hydrolyserate bezüglich des Modellsubstrats, da  $\text{IMP}^{\beta 1i+\beta 2i}$  und IP ungeachtet einer hohen Substrathydrolyserate das Epitop extrem ineffizient generierten.

Die Untersuchung von Schnittpräferenzen der Proteasomsubtypen erfolgte durch die Identifizierung und Quantifizierung der detektierten Prozessierungsprodukte des Modellsubstrats Melan-A<sub>15-40</sub> und der Kalkulation der Intensitäten der Schnittstellen. In **Abb. 16** sind die relevanten Schnittstellen zur Generierung des Epitops und von *Precursor*-Epitopen durch Pfeile dargestellt.





**Abb. 16: Schnittpräferenzen der Proteasomsubtypen.** **(A)** Die zur Generierung des Epitops und von *Precursor*-Epitopen relevanten Schnittstellen des Substrats nach 4 h Degradationszeit sind durch Pfeile eingezeichnet. Die Größe der Pfeile steht in Korrelation zu den Intensitäten der Schnitte. **(B)** Übersicht der Aktivitäten in Zusammenhang mit Schnitten nach den angegebenen Aminosäuren. **(C)** Einfluss der PGPH und ChT-L Aktivität der Proteasomsubtypen auf die Generierung von Melan-A<sub>26-35</sub>. Hohe Aktivitäten sind in Abstufung der Intensitäten mit (+), niedrige mit (-) gekennzeichnet.

Der definierte N-Terminus sowohl des 10mer Epitops Melan-A<sub>26-35</sub> als auch des 9mer Melan-A<sub>27-35</sub> basiert auf einem Schnitt nach der sauren Aminosäure Glu<sup>25</sup> bzw. Glu<sup>26</sup>. Beide Epitope benötigen zur Generierung des C-Terminus einen Schnitt nach der hydrophoben Aminosäure Val<sup>35</sup>. Basierend auf den definierten katalytischen Aktivitäten des Proteasoms wird die Generierung des exakten N-Terminus beider Epitope durch die PGPH Aktivität (saure AS) und des C-Terminus durch die ChT-L Aktivität (hydrophobe AS) vermittelt. Durch die hohe Sequenzhomologie gelten für das 9mer Epitop weitgehend die gleichen Konditionen wie für das 10mer. Aufgrund der Fokussierung auf die Generierung des 10mer Epitops Melan-A<sub>26-35</sub> wird das 9mer Epitop nachfolgend nicht weiter berücksichtigt (siehe 3.2).

Die korrekte Prozessierung des Epitops Melan-A<sub>26-35</sub> erfolgte durch SP äußerst effizient, da der exakte N- und C-Terminus in ausreichenden Mengen generiert und die Sequenz des Epitops nicht durch massiv ausgeprägte interne Schnitte zerstört wird. Basierend auf der effizienten Generierung von Melan-A<sub>26-35</sub> durch SP wurden die Schnittpräferenzen der übrigen Proteasomsubtypen in Relation zu SP analysiert.

Das Muster präferierter Schnittstellen bei Degradation des Substrates zeigte für IMP<sup>β5i</sup> eine leichte Reduktion der Schnittintensitäten nach der sauren Aminosäure Glu<sup>25</sup>, die eine verminderte PGPH Aktivität impliziert. Durch die Reduktion der Aktivität wurde der exakte N- Terminus des Epitops in geringerer Menge prozessiert als durch SP. Die übrigen Proteasomsubtypen IMP<sup>β1i</sup>, IMP<sup>β2i</sup>, IMP<sup>β5i+β1i</sup>, IMP<sup>β5i+β2i</sup>, IMP<sup>β1i+β2i</sup> und IP wiesen hingegen eine drastische Reduktion von Schnitten nach Glu<sup>25</sup> zur Prozessierung des exakten N-Terminus und damit der PGPH Aktivität auf. Die Präferenz von Schnitten zur Generierung des korrekten C-Terminus des Epitops nach Val<sup>35</sup> war nur bei IMP<sup>β1i+β2i</sup> deutlich gesteigert, während IMP<sup>β1i</sup> die gleichen Intensitäten C-terminaler Schnitte wie SP aufwiesen und die Präferenz bei IMP<sup>β5i</sup>, IMP<sup>β2i</sup>, IMP<sup>β5i+β2i</sup>, IMP<sup>β1i+β2i</sup> und IP vermindert war. Aufgrund des hydrophoben Charakters von Valin und den definierten katalytischen Aktivitäten reflektiert die Präferenz dieses Schnittes die ChT-L Aktivität und zeigt sich ebenso in den Intensitäten von Schnitten innerhalb der hydrophoben Aminosäuresequenz des Epitops. In Relation zu SP wiesen ebenfalls IMP<sup>β1i+β2i</sup> vermehrt Schnitte innerhalb der Epitopsequenz auf. IMP<sup>β1i</sup> zeigten zwar leicht verminderte, aber vergleichbare Intensitäten von Schnitten wie SP. Hingegen war die Präferenz von Schnitten nach hydrophoben Aminosäuren in der Epitopsequenz bei IMP<sup>β5i</sup>, IMP<sup>β2i</sup>, IMP<sup>β5i+β1i</sup>, IMP<sup>β5i+β2i</sup> und IP deutlich reduziert. Die

Intensitäten von Schnitten nach Tyr<sup>21</sup> in der N-terminalen Sequenz des Modellsubstrats dienen nur bedingt als Maß der ChT-L Aktivität, da Tyrosin im Gegensatz zu den hydrophoben Aminosäuren der Epitopsequenz einen hydrophileren Charakter aufweist.

N-terminal verlängerte *Precursor*-Epitope von Melan-A<sub>26-35</sub> wurden durch die Proteasomsubtypen in nur geringen Mengen, basierend auf den niedrigen Intensitäten von Schnitten in der N-terminalen Sequenz des Modellsubstrats, generiert. Aufgrund der analogen Effizienzen der Generierung (**Abb. 15**) und der Präsentation (siehe **Abb. 13**, 3.2.2.1) von Melan-A<sub>26-35</sub> scheint die Generierung von *Precursor*-Epitopen nur eine untergeordnete Rolle innerhalb der Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> zu spielen. Zwar ist in Relation zu SP die Generierung von *Precursor*-Epitopen bei IMP<sup>β2i</sup>, IMP<sup>β5i+β1i</sup>, IMP<sup>β5i+β2i</sup> und IP reduziert, allerdings wiesen IMP<sup>β1i</sup> und IMP<sup>β1i+β2i</sup> ähnliche bzw. höhere Mengen an *Precursor*-Epitopen auf. Die vermehrte Generierung von *Precursor*-Epitopen führte allerdings nicht zu einer effizienteren Präsentation des Epitops in Zellen, die den korrespondierenden Proteasomsubtyp exprimieren, im Vergleich zu jenen, deren Proteasomsubtypen *Precursor*-Epitope in nur geringen Mengen generierten.

Die Analysen der Schnittpräferenzen der Proteasomsubtypen zeigten eine dominante Präferenz von Schnitten nach Val<sup>35</sup>, die zur Prozessierung des exakten C-Terminus des Epitops Melan-A<sub>26-35</sub> führten. Zwar waren die Intensitäten von Schnitten nach Val<sup>35</sup> zwischen den einzelnen Proteasomsubtypen divergent, doch innerhalb der Schnittpräferenzen eines Proteasomsubtyps wies der C-terminale Schnitt, gemessen an den übrigen Schnitten zur Generierung des Epitops oder von *Precursor*-Epitopen, die höchste Intensität auf. Im Gegensatz dazu waren die N-terminalen Schnitte weniger exakt definiert bzw. konzentriert und allein SP und zu einem geringeren Anteil IMP<sup>β5i</sup> wiesen hohen Intensitäten von Schnitten nach Glu<sup>25</sup> auf, die eine Generierung des exakten N-Terminus des Epitops determinieren. Basierend auf der Übereinstimmung der Generierungs- mit der Präsentationseffizienz des Epitops in Zellen (siehe **Abb. 15** und **Abb. 13**, 3.2.2.1) zeigen die Analysen der Schnittpräferenzen, dass die Menge der exakten C-terminale Schnitte zumindest bei der überwiegenden Anzahl der untersuchten Proteasomsubtypen nicht limitierend für die Generierung des Epitops ist. Obwohl IP und IMP<sup>β5i+β2i</sup> eine deutliche Abnahme von Schnitten nach Val<sup>35</sup> aufwiesen, führten *vice versa* gesteigerte Intensitäten von Schnitten nach Val<sup>35</sup> bei IMP<sup>β1i+β2i</sup> nicht zu einer effizienteren Epitopgenerierung. Basierend auf der Korrelation der Menge von Schnitten nach Glu<sup>25</sup> der Proteasomsubtypen und der Generierung des Epitops, weisen die Analysen auf eine direkte Abhängigkeit der Generierungseffizienz von der Prozessierung des exakten N-Terminus. Die deutlichen Reduktion der Generierung und der Präsentation des Epitops durch β1i und/oder β2i

beinhaltende Proteasomen bzw. Zellen, die den korrespondierenden Proteasomsubtyp exprimieren, deutet, ungeachtet zum Teil niedriger Inkorporationseffizienzen einzelner Immununtereinheiten (siehe **Abb. 11**, 3.2.2.1), auf eine funktionelle Dominanz von Immununtereinheiten gegenüber ihren konstitutiven Pendants hin.

### 3.2.3 Die Modulation der Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> durch PA28

Neben proteasomalen Immununtereinheiten induziert INF $\gamma$  die Expression des Proteasomregulators PA28, der die Antigenpräsentation bestimmter Epitope verstärken oder sogar essentiell zur Epitopgenerierung sein kann. Allerdings werden viele Epitope auch ohne PA28 effizient generiert. Die Untersuchung eines potenziellen Einflusses von PA28 auf die Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> erfolgte durch die Analyse der Präsentation des Epitops in SP und IP exprimierenden HeLa-Transfektanten unter der Induktion der Expression der PA28-Untereinheiten durch die Transfektion korrespondierender Vektoren. Zur Analyse der Prozessierung von Melan-A<sub>26-35</sub> in Anwesenheit von PA28 wurden *in vitro* Prozessierungsexperimente mit isolierten SP, IP und PA28 durchgeführt.

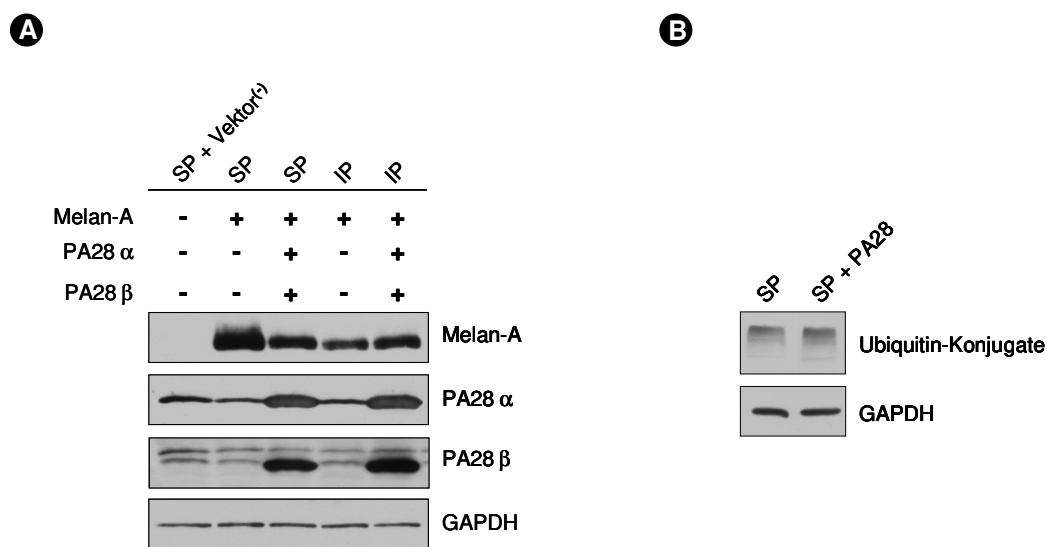
#### 3.2.3.1 Einfluss von PA28 auf die Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub>

Zur Analyse der Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> wurden HeLa-Transfektanten, die SP oder IP exprimieren, mit einem Vektor kodierend für Melan-A und gegebenenfalls mit Vektoren kodierend für die beiden PA28-Untereinheiten PA28 $\alpha$  und PA28 $\beta$  transient transfiziert.

Durch Immunoblotanalysen wurde die Expression der Proteine kontrolliert (**Abb. 17A**). Die entsprechend transfizierten HeLa-Transfektanten wiesen eine deutliche Überexpression von PA28 $\alpha$ , PA28 $\beta$  und Melan-A auf. Beide PA28-Untereinheiten wurden in den korrespondierenden transfizierten Zellen vergleichbar exprimiert. Melan-A hingegen wurde in SP/Melan-A exprimierenden HeLa<sup>HLA</sup>-Zellen im Vergleich zu den übrigen Zellen vermehrt exprimiert.

Um auszuschließen, dass durch eine mögliche Kompetition von PA28 mit dem 19S Regulator Ubiquitin-Konjugate einschließlich Melan-A vermindert abgebaut werden, wurde diese in SP und SP/PA28 exprimierende HeLa<sup>HLA</sup>-Zellen durch Immunoblotanalysen untersucht (**Abb. 17B**). Aufgrund der durch Polyubiquitin vermittelten proteasomalen Degradation von Melan-A (Levy *et al.*, 2005) würde eine verminderte Menge an 26S Proteasomen einen negativen Einfluss auf die Generierung und folglich auf die Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> haben. Bei einer Inhibition der Degradation polyubiquitiniierter Proteine würde es zur Akkumulation von

Polyubiquitin-Konjugaten kommen. SP/PA28 exprimierenden HeLa<sup>HLA</sup>-Zellen wiesen jedoch ein ähnliches Niveau an Polyubiquitin-Konjugaten auf wie allein SP exprimierenden HeLa<sup>HLA</sup>-Zellen. Die Degradation polyubiquitinierte Proteine war folglich durch die Überexpression von PA28 nicht inhibiert.

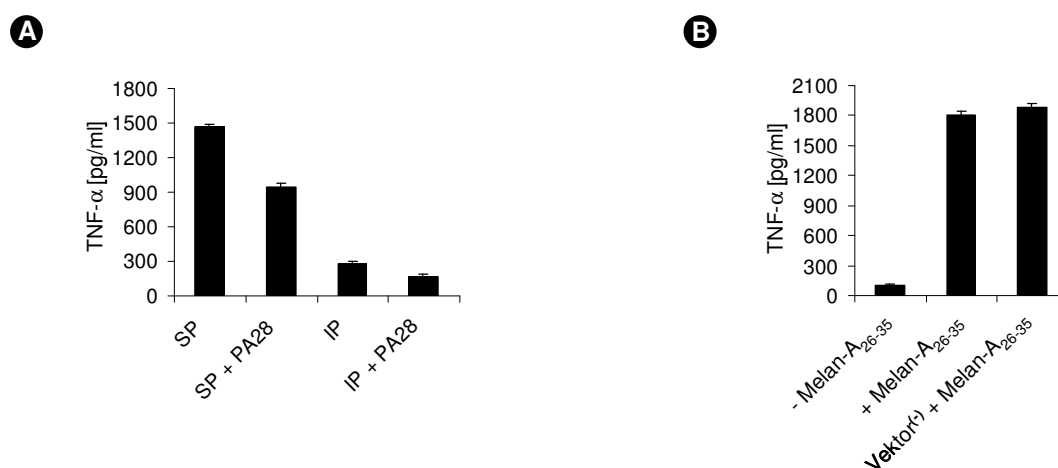


**Abb. 17: Expression von Melan-A, PA28α, PA28β und Untersuchung der Degradation polyubiquitiniierter Proteine in Gegenwart von überexprimiertem PA28. (A)** Immunoblotanalysen zum Nachweis der Expression von Melan-A, PA28α und PA28β durch die transiente Transfektion korrespondierender Vektoren in SP und IP exprimierende HeLa<sup>HLA</sup>-Zellen. Zur Kontrolle, dass die Transfektion keinen Einfluss hat, wurden SP exprimierende HeLa<sup>HLA</sup>-Zellen mit Vektor<sup>(-)</sup> transfiziert. GAPDH diente als Ladekontrolle. **(B)** SP exprimierende HeLa<sup>HLA</sup>-Zellen wurden transient mit Vektoren kodierend für PA28α und PA28β transfiziert und Ubiquitin-Konjugate mittels einem Antikörper gerichtet gegen polyubiquitinierte Proteine detektiert. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet.

Die Analyse der Epitopräsentation der Zellen erfolgte durch CTL-Assays mit Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischen CTL (**Abb. 18**). SP und IP exprimierende HeLa<sup>HLA</sup>-Zellen zeigten bei gleichzeitiger Expression der PA28-Untereinheiten eine deutliche Reduktion in der Erkennung durch Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifische CTL im Vergleich zu den korrespondierenden Zellen, die keine Überexpression von PA28 aufwiesen. Während SP/PA28 exprimierende Zellen eine Reduktion der Antigenpräsentation von ca. 35 % zeigten, war die Präsentation in IP/PA28 exprimierenden Zellen um ca. 40 % reduziert. Die Effizienz der Epitopräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> SP exprimierender Zellen scheint, basierend auf den Analysen der Antigenpräsentation in 3.2.2.1, nicht durch die Stärke der Expression von Melan-A beeinflusst zu sein. Mögliche Konsequenzen des Transfektionsprozesses auf die Expression von HLA-A\*0201 Molekülen auf den Zelloberflächen, die eine Reduktion der Antigenpräsentation bedingen könnten, wurden durch die Transfektion eines nicht kodierenden Vektors (Vektor<sup>(-)</sup>) in allein SP exprimierende HeLa<sup>HLA</sup>-

Zellen und der Gegenwart von exogen dazugegebenen Melan-A<sub>26-35</sub>-Peptiden ausgeschlossen (vergleiche 3.1).

Während PA28 in der Regel die Präsentation spezifischer Epitope intensiviert oder keinen Einfluss auf die Generierung von Epitopen ausübt, wird die Präsentation des Epitops Melan-A<sub>26-35</sub> durch PA28, unabhängig vom Proteasomsubtyp, negativ beeinflusst. Die Expression von PA28 induziert eine deutlich reduzierte Erkennung der Zellen durch Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifische CTL.



**Abb. 18: Einfluss von PA28 auf die Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub>.** Untersuchung der Epitopräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> durch die Erkennung mittels Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischen CTL. **(A)** SP und IP exprimierende HeLa<sup>HLA</sup>-Zellen wurden entweder transient mit einem Vektor kodierend für Melan-A oder in Kombination mit Vektoren kodierend für PA28α und PA28β transfiziert. **(B)** Kontrolle der eingesetzten Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischen CTL über die exogene Beladung von HLA-A\*0201 Molekülen SP exprimierender HeLa<sup>HLA</sup>-Zellen mit Melan-A<sub>26-35</sub>-Peptiden und Transfektionskontrolle durch transiente Transfektion von Vektor(-).

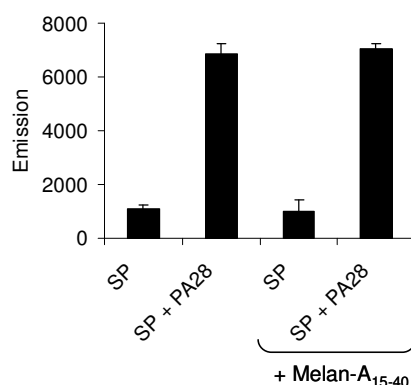
### 3.2.3.2 Einfluss von PA28 auf die Generierung von Melan-A<sub>26-35</sub>

Zur Untersuchung der Prozessierung von Melan-A<sub>26-35</sub> in Gegenwart von PA28 wurde die Degradation des Modellsubstrats Melan-A<sub>15-40</sub> durch isolierte SP und IP (siehe **Abb. 11**, 3.2.2.1) in An- und Abwesenheit von PA28 analysiert. PA28 wurde aus Erythrozyten isoliert und auf mögliche Kontaminationen mit Proteasen untersucht. Hierfür wurde das Modellsubstrat in Anwesenheit von PA28 unter den Bedingungen der *in vitro* Prozessierungsexperimente inkubiert und massenspektrometrisch analysiert. Es zeigten sich keine Degradationsprodukte des Substrates in Gegenwart von PA28, die eine Abwesenheit signifikanter Kontaminationen mit Proteasen demonstrieren (Daten nicht gezeigt).

Basierend auf der Stimulation der proteasomalen Hydrolyse kleinerer fluorogener Substrate *in vitro* durch PA28 (Kloetzel 2001) wurde die funktionelle Integrität der isolierten PA28-Komplexe über

die Aktivierung von SP in An- und Abwesenheit von isolierten PA28-Komplexen durch das fluorogene Substrat Suc-LLVY-AMC analysiert (**Abb. 19**). Zusätzlich wurde eine potenzielle Konkurrenz des Modells substrats mit PA28 untersucht, die beispielsweise für ein Protein des *human immunodeficiency virus-1* (HIV-1 Tat) beschrieben ist (Seeger *et al.*, 1997), und Auswirkungen auf die Generierung haben könnte. Die Untersuchung einer möglichen Konkurrenz erfolgte durch die Zugabe des Modells substrats Melan-A<sub>15-40</sub> zu SP in An- und Abwesenheit von PA28.

Es zeigte sich in der Anwesenheit von PA28 eine 7-fache Steigerung der Aktivität von SP, die eine funktionelle Integrität des isolierten PA28 impliziert. Die Aktivität der Proteasomen war vergleichbar bei Zugabe des Modells substrats. Eine Konkurrenz des Modells substrats mit PA28 um die Interaktion mit dem Proteasom konnte daher ausgeschlossen werden.

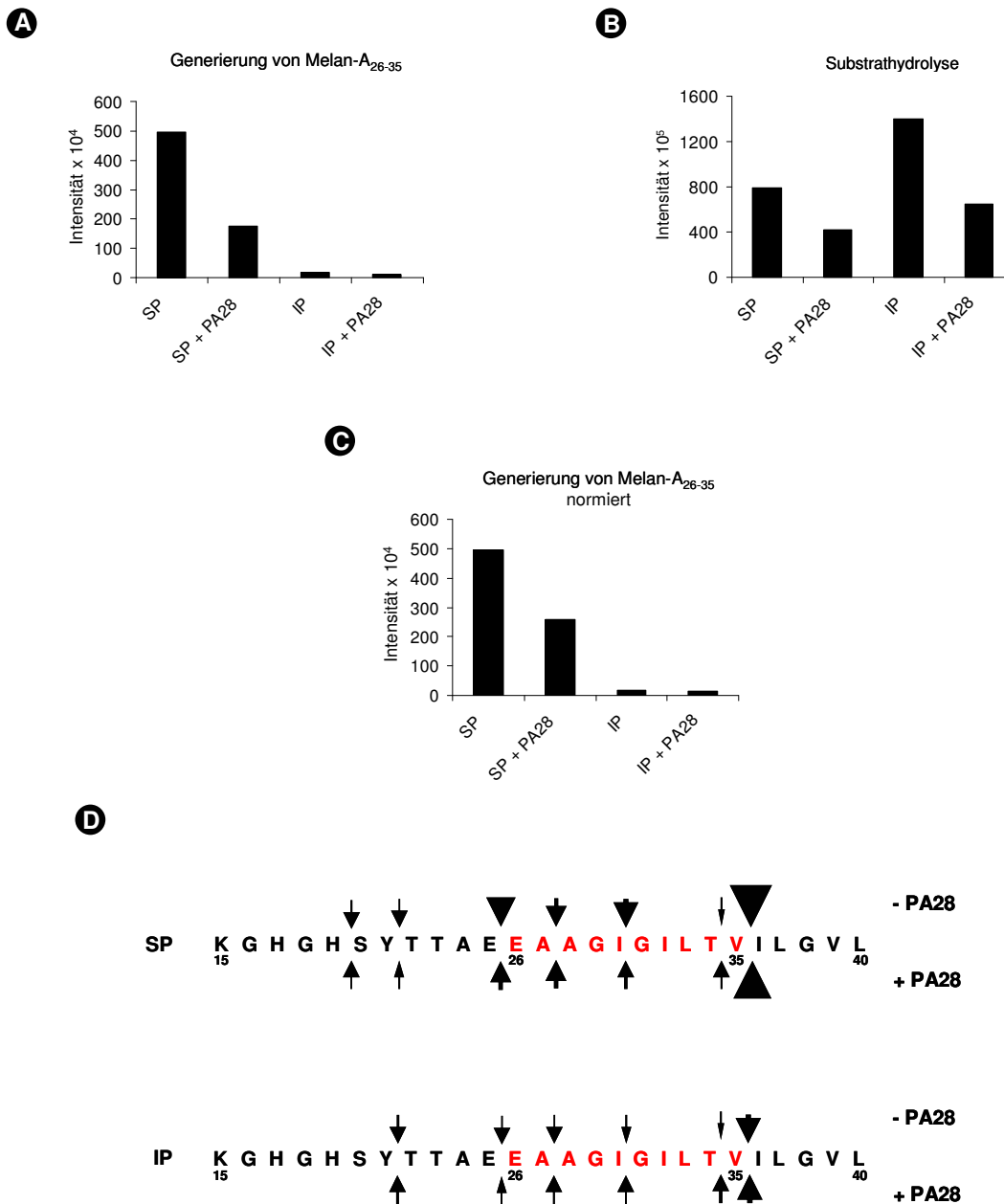


**Abb. 19: Messung der Aktivität von Standardproteasomen in An- und Abwesenheit von PA28 und des Modells substrats.** Die Aktivität von isolierten SP wurde in Gegenwart und Abwesenheit von isolierten PA28 aus Erythrozyten mit Hilfe des fluorogenen Substrats Suc-LLVY-AMC und gegebenenfalls mit Zugabe des Modells substrats Melan-A<sub>15-40</sub> gemessen.

Die Analyse der Prozessierungsprodukte des Modells substrats Melan-A<sub>15-40</sub> nach Degradation durch SP und IP in An- und Abwesenheit von PA28 zeigte eine deutliche Reduktion in der Generierungseffizienz des Epitops Melan-A<sub>26-35</sub> in Gegenwart von PA28 (**Abb. 20A**). Die negative Wirkung von PA28 auf die Generierung des Epitops war bei SP mit ca. 65 % deutlich größer als bei IP mit ca. 40 %. Auch die Rate der Hydrolyse des Modells substrats Melan-A<sub>15-40</sub> von SP und IP wurde durch die Zugabe von PA28 deutlich reduziert (**Abb. 20B**). Diese wurde über die Gesamtmenge neu produzierter Fragmente quantifiziert und ergab eine Reduktion von ca. 50 %.

Basierend auf der bei SP und IP in Anwesenheit von PA28 um ca. 50 % verminderten Hydrolyserate des Modells substrats besteht die Möglichkeit, dass aufgrund der starken Hydrophobizität des Modells substrats und des überwiegend polaren Innenraums der Pore von PA28 der Eintritt des Substrats in das Proteasom inhibiert ist. Unter der Voraussetzung, dass eine

verminderte Substrathydrolyserate auf einer Assoziation des Proteasoms mit PA28 zurückzuführen ist und einem in dieser Ausprägung artifiziell herbeigeführten Zustand entspricht, wurde eine Normierung der Epitopgenerierung durch SP/PA28 und IP/PA28 auf die Differenz der Substrathydrolyserate zwischen SP bzw. IP und SP/PA28 bzw. IP/PA28 (**Abb. 20B**) vorgenommen (**Abb. 20C**). Die Effizienz der Generierung des Epitops war ungeachtet der Normierung auf die Substrathydrolyserate bei SP und IP in Gegenwart von PA28 um ca. 50 % bzw. ca. 20 % reduziert.



**Abb. 20: *In vitro* Generierung von Melan-A<sub>26-35</sub>, Rate der Hydrolyse und Schnittkarte des Modellsubstrats Melan-A<sub>15-40</sub> von SP und IP in An- und Abwesenheit von PA28.** (A) Massenspektrometrische Analyse der Generierung von Melan-A<sub>26-35</sub> durch isolierte SP und IP in An- und Abwesenheit von isolierten PA28 nach 4 h Degradationszeit des Modellsubstrats Melan-A<sub>15-40</sub>. (B) Die Rate der Hydrolyse des Modellsubstrats von SP und IP in An- und Abwesenheit von PA28 nach 4 h Degradationszeit wurde durch die Gesamtmenge von neu produzierten Fragmenten gemessen. (C) Generierung von Melan-A<sub>26-35</sub> nach Normierung auf die Differenz der Substrathydrolyseraten von SP und IP in An- und Abwesenheit von PA28. (D) In den Schnittkarten des Modellsubstrats Melan-A<sub>15-40</sub> von SP und IP in An- und Abwesenheit von PA28 sind die relevanten Schnittstellen zur Generierung des Epitops und von *Precursor*-Epitopen nach 4 h Degradationszeit des Substrats durch Pfeile eingezeichnet. Die Größen der Pfeile korrelieren mit den Intensitäten der Schnitte.

In Analogie zu 3.2.2.2 wurden die proteasomalen Schnittpräferenzen der Proteasomsubtypen analysiert und sind unter Berücksichtigung der Normierung in **Abb. 20D** dargestellt. Die Visualisierung der Schnittpräferenzen von SP und IP in An- und Abwesenheit von PA28 zeigten bei der Degradation des Modellsubstrats durch SP/PA28 und IP/PA28 deutliche Abnahmen der Intensitäten von Schnitten nach Glu<sup>25</sup>, die zu einer Reduktion der Generierung des exakten N-Terminus des Epitops führte. Die Intensitäten von Schnitten zur Generierung des C-Terminus waren hingegen nicht wesentlich verändert. Im Unterschied dazu waren die Schnitte nach Thr<sup>34</sup> innerhalb der Epitopsequenz bei Anwesenheit von PA28 um mehr als das doppelte gesteigert. Die Präferenz dieses Schnittes war besonders bei IP/PA28 im Vergleich zu den Mengen übriger Schnitte dieses Proteasomsubtyps dominant. Die übrigen Schnitte waren entweder leicht oder gar nicht verändert. Ohne eine Normierung der Intensitäten von Schnitten bei SP/PA28 und IP/PA28 sind die Präferenzen mit Ausnahme von Thr<sup>34</sup> für alle Schnittstellen vermindert (Daten nicht gezeigt).

Die Substrathydrolyserate und die Generierung des Epitops wurden durch die Interaktion von 20S Proteasomen mit PA28, unabhängig vom Proteasomsubtyp, negativ beeinflusst. Allerdings ging die durch PA28 induzierte massive Reduktion der Generierung des Epitops über die Abnahme der Substrathydrolyserate weit hinaus. Selbst bei einer potenziellen Inhibition des Substrateintritts in das Proteasom, die zu einer verminderten Substrathydrolyserate führen würde, ist die Generierungseffizienz des Epitops bei SP und IP in Gegenwart von PA28 deutlich vermindert. Die deutlich reduzierte Epitopgenerierung durch PA28 ist durch starke Abnahmen der Intensitäten von Schnitten zur Prozessierung des exakten N-Terminus des Epitops bedingt. Ebenfalls wurde die Präferenz einer untergeordneten Schnittstelle innerhalb der Epitopsequenz durch die Interaktion von SP und IP mit PA28 gesteigert, die bei IP/PA28 in Relation zu den Intensitäten der übrigen Schnitte einen dominant negativen Einfluss auf die Generierung des Epitops ausübt. Die Effizienz der Generierung des Epitops Melan-A<sub>26-35</sub> durch SP und IP in Anwesenheit von PA28 entspricht der Reduktion der Präsentationseffizienz des Epitops in

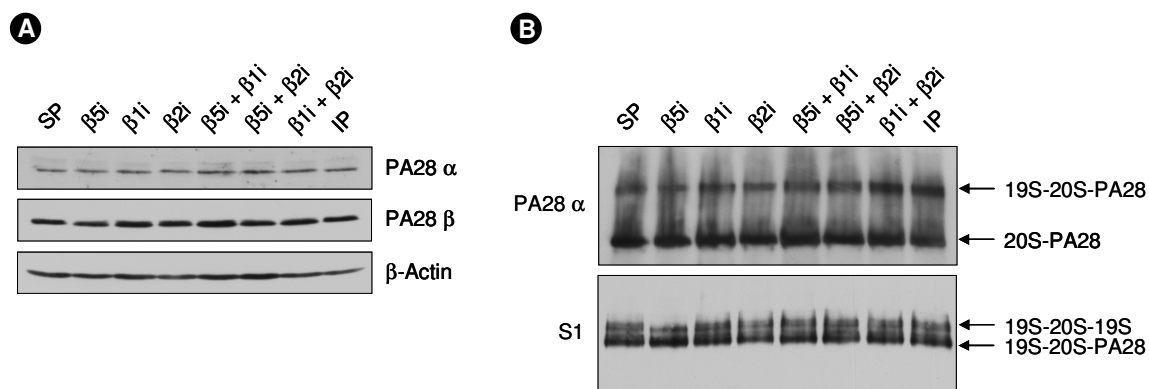


Zellen, die den korrespondierenden Proteasomsubtyp und PA28 exprimieren (siehe **Abb. 18**, 3.2.3.1).

### 3.2.4 Die Assoziation von PA28 und des 19S Regulators mit Proteasomsubtypen

Bei einer bedeutenden Anzahl von MHC Klasse I präsentierten Epitopen reflektiert die *in vitro* Generierung mit Hilfe von Modellsubstraten durch 20S Proteasomen deren Generierung und Präsentation in Bezug auf Qualität und Quantität in Zellsystemen (Kruger *et al.*, 2003). Allerdings könnten, basierend auf dem negativen Effekt von PA28 auf die Generierungseffizienz des Epitops Melan-A<sub>26-35</sub>, die Antigenpräsentationsanalysen aus 3.2.2.1 durch unterschiedliche basale Expressionen von PA28 in den HeLa-Transfektanten und eventuell unterschiedliche Affinitäten von PA28 für spezifische Proteasomsubtypen beeinflusst sein. Zur Untersuchung der Expression und Assoziation von PA28 mit den exprimierten Proteasomsubtypen der HeLa-Transfektanten, wurde zum einen die endogene Expression von PA28 $\alpha$  und PA28 $\beta$  der Zellen durch Immunoblotanalysen unter denaturierenden Bedingungen untersucht (**Abb. 21A**) und zum anderen über native Gelelektrophorese und Immunoblotanalysen die Assoziation von PA28 mit den Proteasomen visualisiert (**Abb. 21B**). Als Kontrolle zum Nachweis von Hybridproteasomen und zur Untersuchung der Assoziation des 19S Regulators mit Proteasomen der HeLa-Transfektanten wurden mit 19S Regulatoren komplexierte Proteasomen über den Nachweis der 19S-Untereinheit S1 (Rpn2) detektiert (**Abb. 21B**). Eine unterschiedliche Assoziation des 19S Regulators mit Proteasomen der verschiedenen HeLa-Transfektanten könnte, durch den über Polyubiquitin-vermittelten Abbau von Melan-A, einen Einfluss auf die Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> ausüben. Alle HeLa-Transfektanten wiesen eine vergleichbare Expression von beiden PA28-Untereinheiten auf, und auch die Assoziation von 20S und 26S Proteasomen mit PA28 zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen HeLa<sup>HLA</sup>-Zelllinien. Ebenfalls wurden keine unterschiedlichen Assoziationen des 19S Regulators mit den Proteasomen der HeLa-Transfektanten nachgewiesen.

Dies demonstriert, dass die Assoziation von PA28 mit Proteasomen nicht durch die Zusammensetzung katalytischer  $\beta$ -Untereinheiten beeinflusst ist und aufgrund der elementar gleichmäßigen Assoziation von PA28 und des 19S Regulators mit den verschiedenen Proteasomsubtypen eine direkte Korrelation der *in vitro* Prozessierungsexperimente und der Präsentationsanalysen des Epitops in den Proteasomsubtypen exprimierenden HeLa<sup>HLA</sup>-Zelllinien möglich ist (vergleiche dazu 3.2.2.1 und 3.2.2.2).



**Abb. 21: Expression von PA28 und die Interaktion von PA28 und des 19S Regulators mit Proteasomen in HeLa-Transfektanten.** (A) Immunoblotanalysen zum Nachweis der Expression von PA28 $\alpha$  und PA28 $\beta$ . Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Actin detektiert. (B) Immunoblotanalysen unter nativen Bedingungen zur Untersuchung der Interaktion von PA28 mit 20S und 26S Proteasomen mit einem gegen PA28 $\alpha$  gerichteten Antikörper. Als Kontrolle wurden mit 19S komplexierte Proteasomen mit einem gegen die 19S-Untereinheit S1 gerichteten Antikörper nachgewiesen.

### 3.3 Identifizierung weiterer Immunevasionsmechanismen von Melanomzellen

Die effiziente Präsentation Tumor-assoziiierter Antigene im Kontext von MHC Klasse I Molekülen ist essentiell zur Eliminierung tumoraler Zellen durch CTL. Veränderungen der Quantität und Qualität von Komponenten, die an der Degradation und Prozessierung von Antigenen beteiligt sind, können einen signifikanten Einfluss auf die Immunogenität tumoraler Zellen haben und folglich zur Immunevasion führen. Beispielsweise wird, wie in 3.2 gezeigt, die Generierung des Epitops Melan-A<sub>26-35</sub> durch  $\beta$ 1i und/oder  $\beta$ 2i beinhaltende Proteasomen dominant negativ beeinflusst.

Zur Identifizierung bisher unbekannter Proteasom-unabhängiger Immunevasionsmechanismen von Melanomzellen, die auf einer Resistenz gegenüber der CTL-vermittelten Cytolyse basieren und in einem direkten Zusammenhang mit dem UPS stehen, wurden Selektionsversuche mit Mel 15-Zellen durchgeführt. Die Zelllinie Mel 15 wurde aus einem metastasierenden malignen Melanom etabliert. Da Mel 15-Zellen HLA-A\*0201 und das Antigen Melan-A exprimieren, sind sie ideal geeignet. Die Selektion apoptose- bzw. cytolyseresistenter Zellen, deren Resistenz auf einer ineffizienten Präsentation des Epitops Melan-A<sub>26-35</sub> beruht, wurde mit Hilfe von Kokultivierungsexperimenten von Mel 15-Zellen mit Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischen CTL durchgeführt.

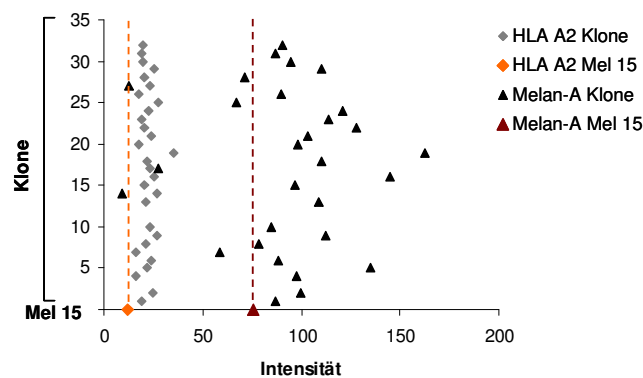
Nicht auf dem UPS beruhende und für Melanomzellen und andere Tumorentitäten bereits hinlänglich beschriebene Evasionsmechanismen, wie z.B. die Verminderung der HLA-A\*0201 Expression, wurden durch die Selektion betreffender Zellen ausgeschlossen. Der Einfluss von aberrant exprimierten Komponenten des UPS, die mit einer verminderten Präsentation des

Tumorepitops Melan-A<sub>26-35</sub> korrelieren, wurde durch die Reduktion der Genexpression, Hemmung der Funktion und Rekonstitutionsversuche analysiert.

### **3.3.1 Selektion von Melanomzellen mit einer defizienten Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub>**

Zur Identifikation von Immunevasionsmechanismen, die auf einer unzureichenden Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> basieren, wurden Mel 15-Zellen durch Kokultivierungszyklen mit Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischen CTL immunselektioniert. Dabei wurden nicht resistente Zellen durch die CTL-vermittelte Cytotoxizität lysiert. Mit Hilfe von wiederholten Kokultivierungen wurde die Situation eines anhaltenden Selektionsdrucks des Immunsystems *in vivo* simuliert, der einen wesentlichen Einfluss auf die Entwicklung von Evasionsphänotypen tumoraler Zellen ausüben kann (siehe 1.3). Die überlebenden und folglich resistenten Melanomzellen wurden zur weiteren Analyse klonal expandiert.

Verminderte Expressionen von MHC Klasse I Molekülen und Tumor-assoziierten Antigenen stellen bereits hinreichend bekannte Möglichkeiten der Immunevasion dar. Der Verlust oder die verminderte Expression dieser Proteine haben einen signifikanten Einfluss auf die Effektivität der CTL-vermittelten Immunantwort und folglich auf die Immunogenität von Tumorzellen. Zur Identifikation neuer Immunevasionsmechanismen musste sowohl eine verminderte Expression von MHC Klasse I Molekülen als auch des Tumor-assoziierten Antigens Melan-A der resistenten Melanomzellen ausgeschlossen werden. Hierfür wurde die Expression von HLA-A\*0201 und Melan-A mittels Durchflusszytometrie untersucht (**Abb. 22**). Durch die Kokultivierungen mit Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischen CTL zeigte sich im Vergleich zu der parentalen Zelllinie Mel 15 eine erhöhte Expression von HLA-A\*0201 aller untersuchten Klone, während die Expression von Melan-A ein heterogenes Muster aufwies. Sie war in den meisten Klonen erhöht und in nur wenigen vermindert. Zur Identifikation neuer Resistenzmechanismen wurden nur Klone weiter analysiert, die keine Reduktion der Expression von HLA-A\*0201 und Melan-A zeigten.

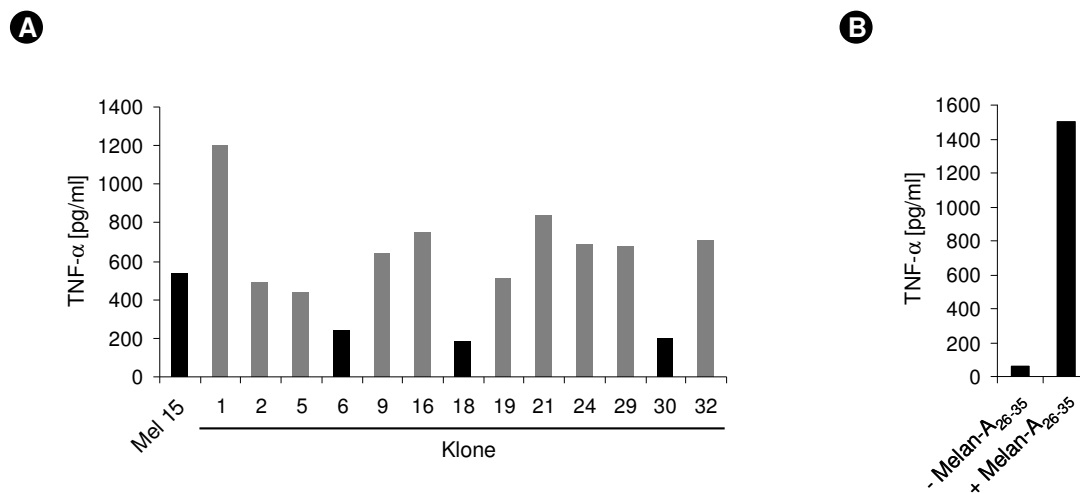


**Abb. 22: Expression von HLA-A\*0201 und Melan-A.** Durchflusscytometrieanalysen zur Detektion von HLA-A\*0201 und Melan-A. Die Expression der Proteine sind als Intensitäten dargestellt. Als gestrichelte Linien sind die HLA-A\*0201 (orange) und Melan-A (rot) Expression der parentalen Zelllinie Mel 15 eingezeichnet.

Zur Identifikation von Klonen, deren Resistenz gegenüber Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischen CTL auf einer ineffizienten Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> basieren könnte, wurde die Epitoppräsentation der Klone mittels CTL-Assays über die Erkennung durch Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifische CTL untersucht (**Abb. 23A**). Die Spezifität der eingesetzten CTL gegenüber dem Epitop Melan-A<sub>26-35</sub> wurde mit Hilfe von Mel 91-Zellen (Melan-A<sup>(-)</sup>) in An- und Abwesenheit exogener Melan-A<sub>26-35</sub>-Peptide bezüglich der CTL-Stimulation verifiziert (**Abb. 23B**).

In Relation zu Mel 15 zeigten drei Klone (Klone 6, 18, 30) eine verminderte Erkennung durch Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifische CTL. Die übrigen Klone wiesen in der Mehrzahl eine Steigerung der Epitoppräsentation auf, und nur wenige zeigten eine äquivalente Antigenpräsentation.

Die Klone 6, 18 und 30 zeigten eine um mindestens 60 % reduzierte CTL-Erkennung und wurden daher aufgrund ihrer defizienten Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> zur Identifizierung neuer Resistenzmechanismen weiter analysiert.



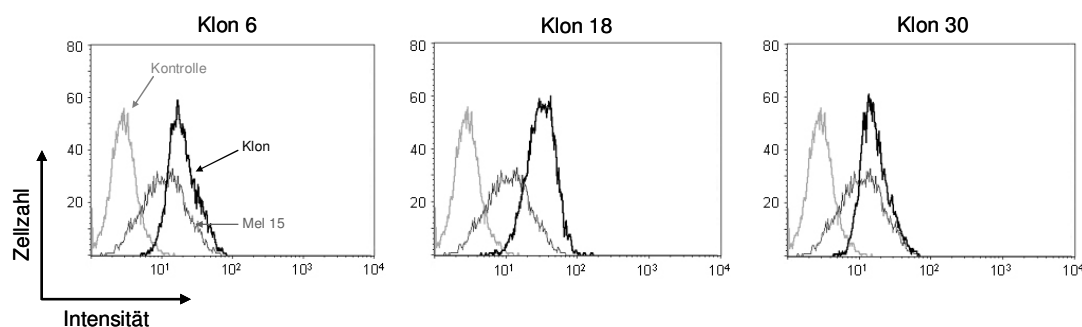
**Abb. 23: Analyse der Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub>.** Die Erkennung der angegebenen Zellen durch Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifische CTL wurde über die Sekretion von TNF- $\alpha$  gemessen. E:T=1:1. **(A)** Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> der selektierten Melanomzellklone in Relation zu Mel 15-Zellen. **(B)** Die Spezifität der eingesetzten Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischen CTL wurde durch die exogene Zugabe von Melan-A<sub>26-35</sub>-Peptiden bzw. deren Abwesenheit verifiziert.

### 3.3.2 Ausschluss bekannter Immunevasionsmechanismen von Melanomzellen

Die Klone 6, 18 und 30, die eine stark reduzierte Präsentation des Epitops Melan-A<sub>26-35</sub> aufwiesen, wurden auf Immunevasionsmechanismen untersucht, die zum einen direkt mit einer verminderten Präsentation des Epitops im Zusammenhang stehen, wie eine verminderte Expression von HLA-A\*0201 Molekülen, des Antigens Melan-A und des TAP-Transporters oder zum anderen auf einer eingeschränkten Lysierbarkeit durch CTL beruhen und dementsprechend auf einer Resistenz gegenüber der Perforin/Granzym oder der Rezeptor (z.B. Fas) vermittelten Cytolyse basieren. Ebenfalls wurde untersucht, ob die resistenten Klone eine Insensitivität gegenüber INF $\gamma$  aufweisen, was die Induktion der Expression von Komponenten der Antigenprozessierungsmaschinerie durch INF $\gamma$  inhibieren würde und folglich einen direkten Einfluss auf die Immunogenität der Zellen hätte.

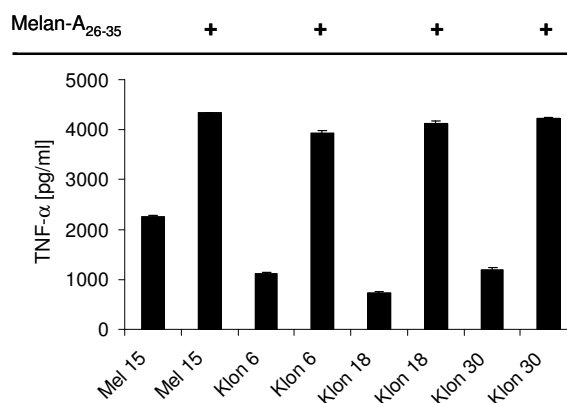
#### 3.3.2.1 Expression von HLA-A\*0201

Die HLA-A\*0201 Expression auf den Zelloberflächen der Klone wurde im Detail mittels Durchflusszytometrie verifiziert (**Abb. 24**). Im Vergleich zu parentalen Mel 15-Zellen wiesen die Klone 6, 18, und 30 eine erhöhte Expression von HLA-A\*0201 Molekülen auf.



**Abb. 24: Expressionsanalysen von HLA-A\*0201 Molekülen.** Durchflusscytometrieanalysen zur Detektion von HLA-A\*0201 Molekülen auf den Zelloberflächen der angegebenen Klone in Relation zu Mel 15-Zellen. Zur Kontrolle wurden Mel 15-Zellen mit einem Antikörper gerichtet gegen murines IgG behandelt.

Zur Analyse eines potenziellen funktionellen Zusammenhangs zwischen einer erhöhten HLA-A\*0201 Expression und der Erkennung durch Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifische CTL wurden die Klone und Mel 15 durch die An- und Abwesenheit exogener Melan-A<sub>26-35</sub>-Peptide im Überschuss auf die Erkennung gegenüber Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischen CTL untersucht (**Abb. 25**).

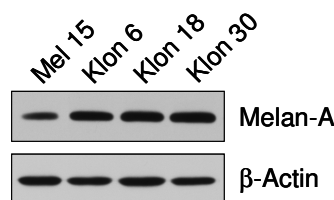


**Abb. 25: Funktionsanalysen von HLA-A\*0201 Molekülen.** Analyse der Epitopräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> durch Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifische CTL in An- und Abwesenheit exogener Melan-A<sub>26-35</sub>-Peptide. E:T=1:1

Durch die exogene Beladung von HLA-A\*0201 Molekülen der Zelloberflächen mit Melan-A<sub>26-35</sub>-Peptiden kann die maximale Stimulierbarkeit durch CTL analysiert werden und ermöglicht Aussagen über eine potenzielle Limitierung der HLA-A\*0201 Expression für eine effiziente Antigenpräsentation. In Relation zu Mel 15 zeigten die Klone eine vollständige Rekonstitution der CTL-Stimulation. Die Erkennung von Mel 15 und den drei Klonen durch CTL war in Anwesenheit exogener Peptide vergleichbar. Das Niveau der HLA-A\*0201 Expression war demnach nicht limitierend für die effiziente Präsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> und der Stimulation von CTL.

### 3.3.2.2 Expression von Melan-A

In Relation zu Mel 15-Zellen wurde die Expression des Tumor-assoziierten Antigens Melan-A der Klone 6, 18, und 30 mittels Immunoblotanalysen untersucht (**Abb. 26**). Im Vergleich zu Mel 15 wiesen die Klone eine erhöhte Expression von Melan-A. auf, die allerdings keinen Einfluss auf die Effizienz der Antigenpräsentation des Epitops zu haben scheint (siehe **Abb. 23**, 3.3.1). Daher kann eine defiziente Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub>, aufgrund einer reduzierten Expression von Melan-A ausgeschlossen werden.



**Abb. 26: Expression von Melan-A.** Immunoblotanalysen zur Detektion von Melan-A in den resistenten Klonen und Mel 15. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Actin nachgewiesen.

### 3.3.2.3 Expression des TAP-Transporters

Der TAP-Transporter hat eine zentrale Funktion in der Beladung von MHC Klasse I Molekülen mit antigenen Peptiden und folglich in ihrer Assemblierung. Die funktionelle und strukturelle Integrität des TAP-Transporters hat daher einen wesentlichen Einfluss auf die Antigenpräsentation von Epitopen die über TAP ins ER transportiert werden, wie Melan-A<sub>26-35</sub> (Ferry Ossendorp, persönliche Kommunikation). Daher wurden im Vergleich zu Mel 15-Zellen die Expression beider Untereinheiten in den Klonen 6, 18 und 30 durch Immunoblotanalysen untersucht, um einen defizienten Transport des Epitops ins ER und folglich eine ineffiziente Beladung von HLA-A\*0201 Molekülen auszuschließen (**Abb. 27**). In Relation zu Mel 15-Zellen war die Expression von TAP1 und TAP2 in allen Klonen nicht vermindert.



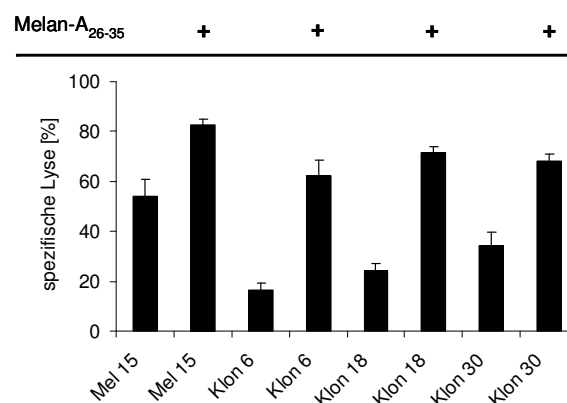
**Abb. 27: Expression von TAP1 und TAP2.** Immunoblotanalysen zum Nachweis von TAP1 und TAP2 der resistenten Klone und Mel 15. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Actin detektiert.

### 3.3.2.4 Resistenz gegenüber der CTL-vermittelten Cytolyse

Neben den beschriebenen Immunevasionsmechanismen, die mit einer ineffizienten Antigenpräsentation korrelieren, existieren alternative molekulare Mechanismen, die mit einer unzureichenden Cytolyse durch CTL assoziiert sind. Zusätzlich zur Erkennung des Antigens durch den T-Zellrezeptor von CTL sind kostimulatorische Moleküle, wie beispielsweise Fas auf den Zelloberflächen von Zellen obligat, zur Induktion einer effizienten Apoptose. Ebenfalls können Tumorzellen inhibitorische Moleküle der Perforin/Granzym vermittelten Cytolyse exprimieren.

Um auszuschließen, dass die Resistenz der Klone 6, 18 und 30 auf einer Insensitivität der CTL-vermittelten Cytotoxizität beruht, wurden die Klone einem Cytotoxizitätstest ( $^{51}\text{Cr}$  release assay) unterzogen (**Abb. 28**). Der Test basiert auf der Markierung von Zellen mit  $^{51}\text{Cr}$ , das durch die Lyse der Zellen mittels CTL freigesetzt und anschließend quantifiziert wird. Die drei Klone und Mel 15-Zellen wurden in An- und Abwesenheit exogener Melan-A<sub>26-35</sub>-Peptide analysiert, deren Gegenwart eine vergleichbare Erkennung der verschiedenen Zellen durch Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifische CTL gewährleistet (**Abb. 25**, 3.3.2.1). In Relation zu Mel 15-Zellen wiesen die Klone in Abwesenheit exogener Peptide eine drastisch verminderte Sensitivität gegenüber der CTL-vermittelten Lyse auf. Im Gegensatz dazu zeigten die Klone bei Beladung mit Melan-A<sub>26-35</sub>-Peptiden eine cytotoxische Sensitivität nahe dem Niveau von Mel 15.

Dies zeigt, dass die Resistenz gegenüber der CTL-vermittelten Cytolyse auf die drastisch verminderten Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> und insofern auf eine verminderte CTL-Erkennung zurückzuführen ist und nicht auf einem Resistenzmechanismus gegenüber der Induktion der Cytolyse durch CTL *per se*.



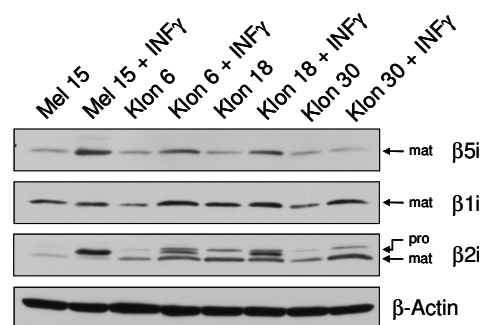


**Abb. 28: Cytotoxizitätstest selektionierter Klone.** Die spezifische Lyse von Mel 15-Zellen und den Klonen 6, 18 und 30 durch Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifische CTL wurde in der An- und Abwesenheit von exogenen Melan-A<sub>26-35</sub>-Peptiden mit Hilfe eines <sup>51</sup>Cr release assays ermittelt. E:T=10:1

### 3.3.2.5 INF $\gamma$ -Sensitivität und Expression INF $\gamma$ -induzierter Proteasomsubtypen

Zum Ausschluss einer potenziellen Insensitivität der Klone gegenüber INF $\gamma$ , die beispielsweise auf einer Inhibition der Signaltransduktion und dementsprechend auf einer ineffizienten Expression INF $\gamma$  regulierter Gene basiert, wurde die Expression der INF $\gamma$  induzierbaren Proteasomuntereinheiten  $\beta$ 5i,  $\beta$ 2i und  $\beta$ 1i mittels Immunoblotanalysen untersucht (**Abb. 29**). Zusätzlich zur INF $\gamma$ -Sensitivität ermöglichen die Analysen Informationen zur Expression von IP bzw. IMP der Klone und Mel 15, da die Zusammensetzung von Proteasomsubtypen einen wesentlichen Einfluss auf die Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> ausüben kann (siehe 3.2).

Die Zellen zeigten nach INF $\gamma$ -Exposition eine deutliche Induktion in der Expression der Immunountereinheiten und folglich eine Sensitivität gegenüber der INF $\gamma$ -vermittelten Signaltransduktion. Allerdings wies die Expression der drei Immunountereinheiten  $\beta$ 5i,  $\beta$ 1i und  $\beta$ 2i ein heterogenes Muster in den untersuchten Klonen und der Zelllinie Mel 15 auf. Ebenfalls zeigten sich Unterschiede in der Maturierung und dementsprechend im Einbau von Immunountereinheiten. Die Effizienz des Einbaus katalytischer Untereinheiten in Proteasomen kann durch die Prozessierung ihrer Proproteine in ihre maturierte Form unter Freisetzung des endständigen katalytischen Threonins bestimmt werden. Sowohl Mel 15-Zellen als auch die Klone wiesen bereits ohne INF $\gamma$ -Exposition eine basale Expression der Immunountereinheiten auf. Allerdings wurde durch INF $\gamma$  die vermehrte Expression der Immunountereinheiten induziert, mit Ausnahme von  $\beta$ 1i in Mel 15-Zellen und  $\beta$ 5i in Klon 30, deren Expression nicht gesteigert wurde. Darüber hinaus wurde in Mel 15-Zellen, ungeachtet einer deutlich vermehrten Expression von  $\beta$ 2i nach INF $\gamma$ -Stimulation, die Immunountereinheit ausschließlich als Proprotein detektiert, was auf einen defizienten Einbau von  $\beta$ 2i in die Proteasomen hindeutet.

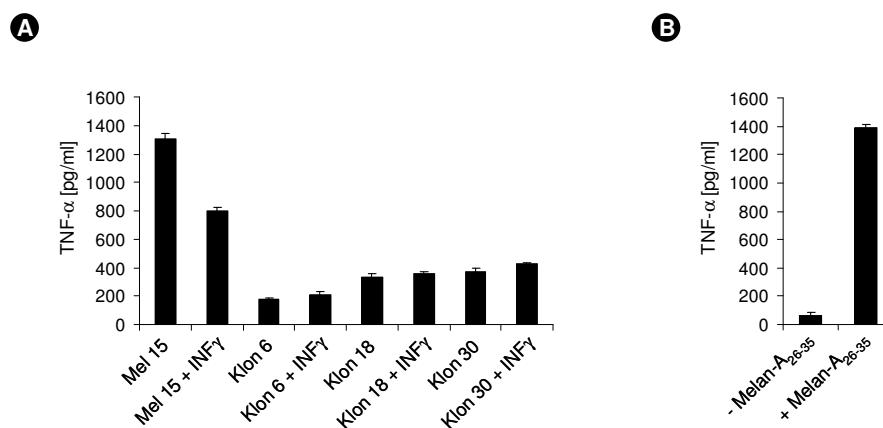


**Abb. 29: Expression von Immununtereinheiten der selektierten Klone und Mel 15.** Immunoblotanalysen der angegebenen Zellen mit Antikörpern gerichtet gegen die Immununtereinheiten  $\beta 5i$ ,  $\beta 1i$  und  $\beta 2i$ . Die entsprechenden Zellen wurden mit 200 U/ml  $\text{INF}\gamma$  für 24h behandelt. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Actin detektiert. pro: Proprotein, mat: maturiertes Protein

### 3.3.2.6 Einfluss von $\text{INF}\gamma$ auf die Antigenpräsentation

$\text{INF}\gamma$  fördert in der Regel die antitumorale Immunität von Zellen durch die Induktion von Komponenten der Antigenprozessierungsmaschinerie. Beispielsweise kann die Effizienz der Epitopräsentation durch die Intensivierung der Expression von MHC Klasse I Molekülen oder des TAP-Transportes gesteigert werden. Wie bereits in 3.2 gezeigt, wird im Gegensatz dazu die Antigenpräsentation von Melan- $A_{26-35}$  durch die  $\text{INF}\gamma$ -induzierte Expression von IP oder spezifischen IMP drastisch vermindert.

Zur Untersuchung von  $\text{INF}\gamma$  induzierten Effekten auf die Antigenpräsentation von Melan- $A_{26-35}$  der Klone 6, 18 und 30 wurden die Klone und parentale Mel 15-Zellen  $\text{INF}\gamma$  exponiert. Die Analyse der Epitopräsentation von Melan- $A_{26-35}$  erfolgte mit Hilfe von Melan- $A_{26-35}$ -spezifischen CTL (**Abb. 30**).



**Abb. 30: Antigenpräsentation von Melan- $A_{26-35}$  nach  $\text{INF}\gamma$ -Exposition.** Analyse der Epitopräsentation von Melan- $A_{26-35}$  durch die Stimulation von Melan- $A_{26-35}$ -spezifischen CTL. E:T=1:1 (A) Die selektierten Klone und Mel 15-Zellen wurden mit 200 U/ml  $\text{INF}\gamma$  für 24 h behandelt. (B) Die Spezifität der eingesetzten Melan- $A_{26-35}$ -spezifischen CTL wurde durch die An- und Abwesenheit exogener Melan- $A_{26-35}$ -Peptide kontrolliert.

Das Niveau der Antigenpräsentation der Klone war wesentlich geringer als das von Mel 15-Zellen. Darüber hinaus zeigten im Gegensatz zu Mel 15 die Klone nach  $\text{INF}\gamma$ -Exposition keine Unterschiede in der Effizienz der Epitopräsentation verglichen mit ihren unstimulierten Pendanten.

In Bezug zu den Immunoblotanalysen der Klone und Mel 15-Zellen in 3.3.2.5 basiert der Effekt der konstant niedrigen Antigenpräsentation von Melan- $A_{26-35}$  der Klone in An- und Abwesenheit

von INF $\gamma$  demnach nicht auf einer bereits *per se* hohen Expression und Inkorporation der Immununtereinheiten  $\beta$ 1i,  $\beta$ 2i oder  $\beta$ 5i. Gleichmaßen hatte die INF $\gamma$ -induzierte Expression von  $\beta$ 1i,  $\beta$ 2i bzw.  $\beta$ 5i beinhaltenden Proteasomen keinen Einfluss auf die Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> (vergleiche 3.2). Damit konnte ein wesentlicher Einfluss von Immununtereinheiten auf die Immunevasion der Klone 6, 18 und 30 gegenüber Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischen CTL ausgeschlossen werden.

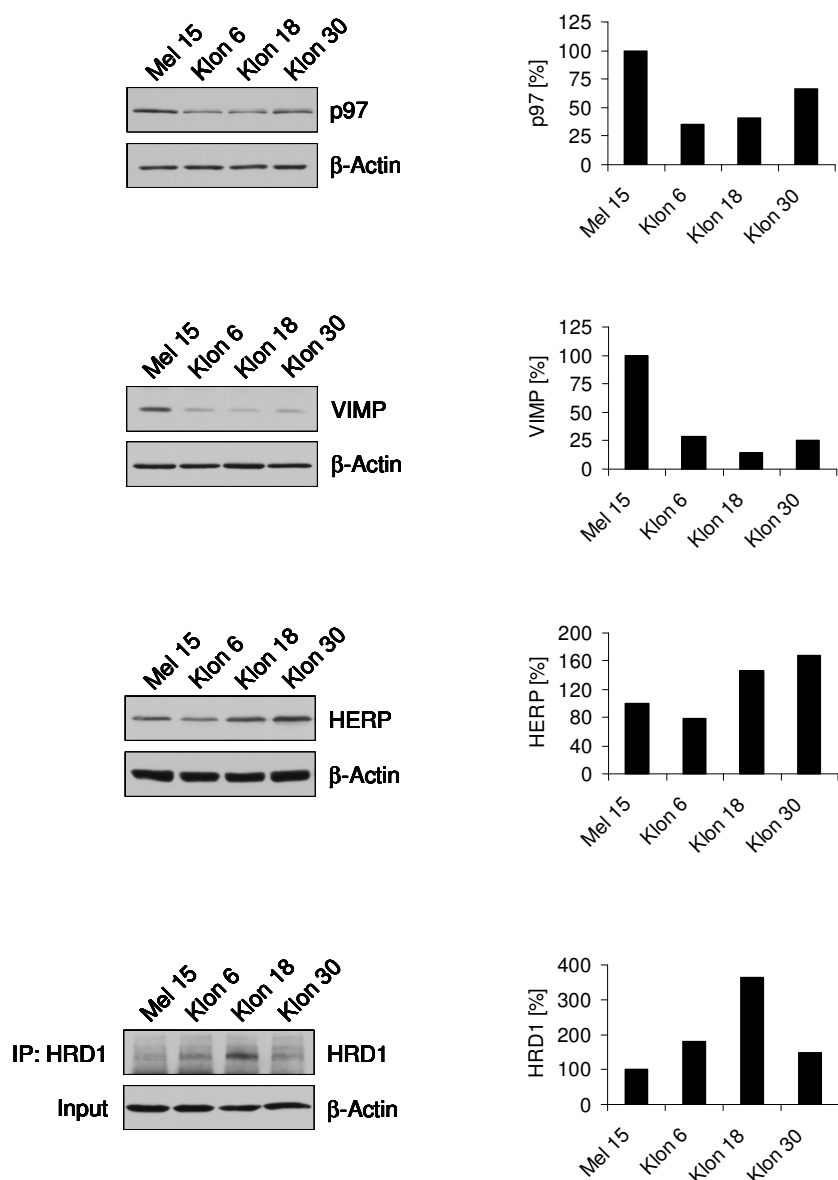
### 3.3.3 Expressionsanalysen immunselektionierter Melanomzellen

Da für die Klone 6, 18 und 30 bereits beschriebene Resistenzmechanismen von Tumorzellen gegenüber der CTL-vermittelten Immunantwort ausgeschlossen werden konnten, wurden in einem ersten Schritt *Microarray*-Genexpressionsanalysen von Komponenten des UPS und assoziierter Faktoren durchgeführt, um an der verminderten Präsentation des Epitops beteiligte Faktoren zu identifizieren (**Abb. 31**). Die Genexpression der drei resistenten Klone wurde in Relation zu der Expression von Genen der parentalen Zelllinie Mel 15 gesetzt. Im Vergleich zu Mel 15 wiesen alle drei Klone Unterschiede in der Expression von Genen der ER-assoziierten Degradation auf. Aufgrund der ER-Lokalisation des Transmembranproteins Melan-A stellt dieses ein wahrscheinliches Substrat des ERAD-Komplexes dar, weil dessen proteasomale Degradation, und folglich die Generierung des Epitops Melan-A<sub>26-35</sub>, eine Retrotranslokation des Proteins ins Cytosol erfordert.

Gen	Klon 6	Klon 18	Klon 30
<b>p97</b>	-1,7	-2	-2
<b>VIMP</b>	-1,4	-1,3	-1,3
<b>HERP</b>	-1,2	-1,4	1,7
<b>HRD1</b>	-1,6	-1,6	-1,6

**Abb. 31: *Microarray*-Genexpressionsanalysen.** Angegeben ist der Faktor, um den sich die Genexpression der Klone von dem der parentalen Zelllinie Mel 15 unterscheidet.

In einem zweiten Schritt wurden die Proteinexpression der durch *Microarray*-Genexpressionsanalysen ermittelten dysregulierten ERAD-Komponenten analysiert. Die Untersuchungen der Proteinexpression erfolgte durch Immunoblotanalysen und densitometrischer Auswertungen der detektierten Proteinbanden (**Abb. 32**).



**Abb. 32: Expressionsanalysen spezifischer ERAD-Komponenten.** Immunoblotanalysen (links) der selektionierten Klone und Mel 15-Zellen zum Nachweis von p97, VIMP, HERP und HRD1. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Actin detektiert. Die Proteinbanden wurden densitometrisch analysiert und die Expressionen der entsprechenden Proteine von Mel 15-Zellen auf 100 % gesetzt (rechts).

Die Expression der Proteine p97, VIMP und HERP wurden aus Gesamtzelllysaten ermittelt. Aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit eines effizienten und nicht kreuzreaktiven HRD1-Antikörpers wurde zur Detektion der Expression von HRD1 das Protein aus Gesamtzelllysaten mit einem Antikörper gerichtet gegen HRD1 immunpräzipitiert und die Präzipitate nachfolgend mit dem gleichen Antikörper mittels Immunoblotanalysen detektiert. Die Verifikation gleicher zur Immunpräzipitation eingesetzter Proteinmengen erfolgte durch den Nachweis von  $\beta$ -Actin der jeweiligen verwendeten Gesamtzelllysate (Input). Die Proteinexpressionsanalysen zeigten in Relation zu Mel 15-Zellen eine deutlich verminderte Expression von p97 und VIMP in allen drei

Klonen. HERP war mit Ausnahme von Klon 6 in den übrigen Klonen, verglichen mit Mel 15, vermehrt exprimiert, und alle Klone wiesen eine ausgeprägt erhöhte Expression von HRD1 auf. Speziell Klon 18 zeigte eine vierfach stärkere Expression von HRD1 als Mel 15-Zellen.

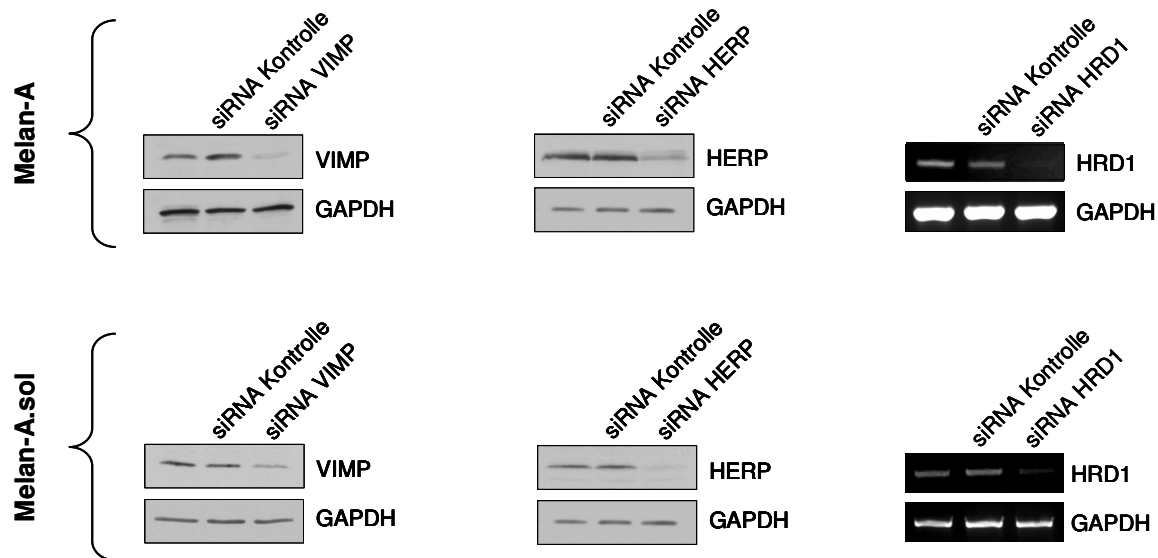
Die Dysregulation spezifischer ERAD-Komponenten könnte im Kontext einer potenziellen ERAD-abhängigen Degradation von Melan-A mit der defizienten Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> der resistenten Klone im Zusammenhang stehen.

### 3.3.4 Einfluss der ER-assoziierten Degradation auf die Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub>

Basierend auf der in den Expressionsanalysen ermittelten Dysregulation spezifischer ERAD-Komponenten wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen der ER-assoziierten Degradation und der Präsentation des Epitops Melan-A<sub>26-35</sub> untersucht. Die Analyse einer ERAD-abhängigen Generierung von Melan-A<sub>26-35</sub> erfolgte durch die Untersuchung der Epitopräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> unter gleichzeitiger Verminderung der Expression und Hemmung der Funktion von Komponenten der ER-assoziierten Degradation. Melanomzellen, die keine endogene Expression von Melan-A aufweisen (Mel 91), wurden transient mit einem Vektor kodierend für Melan-A oder alternativ mit einem Vektor kodierend für eine lösliche, cytoplasmatische Mutante von Melan-A (Melan-A.sol) transfiziert (Rimoldi *et al.*, 2001). Unter der gleichzeitigen Expression des cytoplasmatischen Melan-A.sol und der Verminderung der Expression und Hemmung der Funktion spezifischer ERAD-Komponenten sollte die Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> unter der Prämisse einer ERAD-Abhängigkeit nicht beeinflusst sein. Darüber hinaus können weitere potenzielle Funktionen der vermindert exprimierten oder funktional gehemmten ERAD-Komponenten, die mit der Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> korrelieren könnten, ausgeschlossen werden. Auf Basis der cytoplasmatischen Lokalisation von Melan-A.sol und der damit ERAD unabhängigen Degradation, wird eine direkte Korrelation der ER-assoziierten Degradation mit der Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> ermöglicht.

Die Inhibition der Expression von VIMP, HERP und HRD1 erfolgte durch die Transfektion korrespondierender siRNAs unter paralleler Expression von Melan-A oder Melan-A.sol. Um die Funktion endogenen p97 zu hemmen, wurde ein Vektor kodierend für eine dominant negative Mutante von p97 (p97 QQ) transfiziert (Ye *et al.*, 2003). Die Effizienz der transfizierten siRNAs wurde im Falle von VIMP und HERP durch Immunoblotanalysen und bei HRD1, aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit eines effizienten Antikörpers, durch RT-PCR kontrolliert (**Abb. 33**).

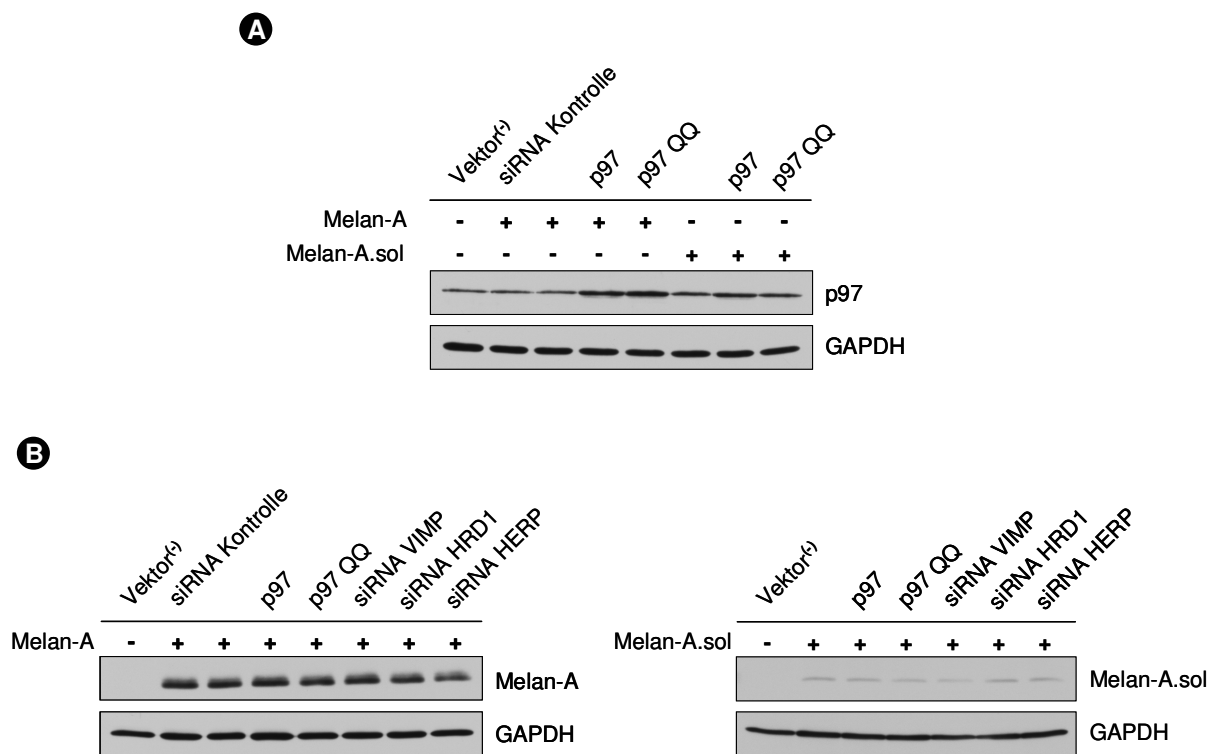
Durch die Transfektion der jeweiligen siRNAs zeigte sich eine signifikante Reduktion der Expression von VIMP, HERP und HRD1 in den entsprechenden Zellen.



**Abb. 33: Expressionskontrollen von VIMP, HERP und HRD1.** Immunoblotanalysen zur Detektion von VIMP und HERP sowie RT-PCR zum Nachweis von HRD1 der mit einem Vektor kodierend für Melan-A oder Melan-A.sol und den angegebenen siRNAs transient transfizierten Zellen. Zur Kontrolle der Transfektion mit siRNAs wurden Mel 91 mit Kontroll-siRNA transfiziert. Als Ladekontrolle wurde GAPDH detektiert.

Die Expression von p97 QQ wurden ebenfalls mittels Immunoblotanalysen verifiziert und zeigte eine effiziente Expression (**Abb. 34A**). Zusätzlich wurden Mel 91-Zellen simultan mit einem Vektor kodierend für natürliches p97 und für Melan-A oder Melan-A.sol transfiziert, um mögliche Folgen durch die Überexpression von p97 QQ *per se*, die eine Inhibition der Antigenpräsentation induzieren könnten, auszuschließen. Durch Immunoblotanalysen wurde die Expression von p97 kontrolliert, die in den entsprechend transfizierten Zellen eine deutliche Zunahme der Expression zeigten (**Abb. 34A**).

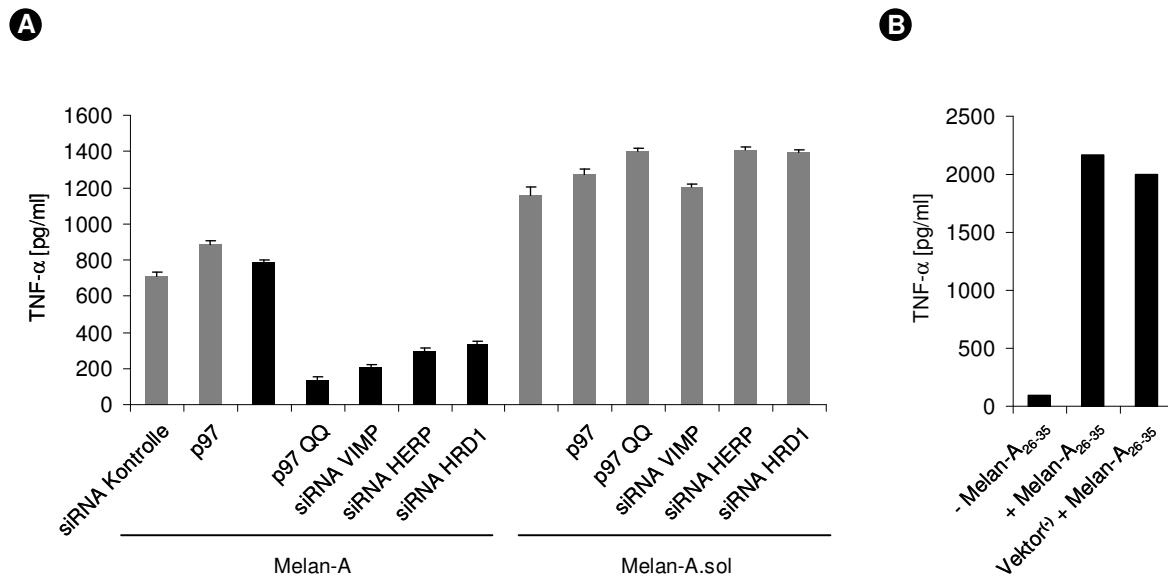
Die parallele Expression von Melan-A und Melan-A.sol durch die Transfektion korrespondierender Vektoren wurden mittels Immunoblotanalysen verifiziert (**Abb. 34B**). Beide Proteine wurden in den entsprechenden Zellen in äquivalenten Mengen exprimiert. Allerdings war Melan-A.sol im Vergleich zu Melan-A, ungeachtet der 10fachen Menge eingesetzten Gesamtzelllysats, in nur geringem Maße in den jeweiligen Zellen nachzuweisen.



**Abb. 34: Expressionskontrollen von p97, p97 QQ, Melan-A und Melan-A.sol.** Mel 91-Zellen wurden transient mit Vektoren kodierend für Melan-A, Melan-A.sol, p97 und p97 QQ sowie siRNAs spezifisch für VIMP, HERP und HRD1 in den angegebenen Kombinationen transfiziert. Zur Kontrolle der Transfektion mit Vektoren wurden Mel 91 transient mit Vektor(-) transfiziert und für siRNAs mit Kontroll-siRNA. Als Ladekontrolle wurde GAPDH detektiert. **(A)** Immunoblotanalysen zur Detektion von p97 und p97 QQ der in den angegebenen Kombinationen transfizierten Zellen. **(B)** Immunoblotanalysen der angegebenen Zellen zur Detektion von Melan-A und Melan-A.sol.

Nachdem Interaktionen aufgrund der Transfektionen ausgeschlossen werden konnten, wurden Analysen der Epitopräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> durch Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifische CTL angeschlossen. Es zeigte sich eine drastisch verminderte Antigenpräsentation des Epitops durch die die Hemmung der Funktion endogenen p97 und der verminderten Expression von VIMP, HERP und HRD1 während simultaner Expression von Melan-A (**Abb. 35**). Im Gegensatz dazu war die Antigenpräsentation während der Expression der cytoplasmatischen Mutante Melan-A.sol nicht beeinflusst. Melan-A.sol exprimierende Zellen zeigten im Vergleich zu Melan-A exprimierenden Zellen sogar eine wesentlich effizientere Präsentation des Epitops Melan-A<sub>26-35</sub>. Dies weist, in Relation zu der geringeren Detektion von Melan-A.sol mittels Immunoblotanalysen, auf eine erhöhte Degradation des mutierten Proteins verglichen mit natürlichen Melan-A hin. Zellen, die mit einem Vektor kodierend für p97 und Melan-A transfiziert wurden, wiesen eine leicht erhöhte Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub>, verglichen mit exklusiv Melan-A exprimierenden Zellen, auf. Ein inhibitorischer Effekt auf die Epitopräsentation durch die Überexpression von p97 bzw. p97 QQ konnte daher ausgeschlossen werden. Aus den vorliegenden Ergebnissen kann demnach geschlossen werden,

dass das ERAD-System ein limitierender Faktor für die effiziente Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> ist.



**Abb. 35: Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> während der Verminderung der Expression oder Funktion spezifischer ERAD-Komponenten.** Analyse der Epitopräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> durch die Stimulation Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischer CTL über die Sekretion von TNF-α. E:T=1:1 **(A)** Mel 91-Zellen wurden in den angegebenen Kombinationen mit korrespondierenden Vektoren für Melan-A, Melan-A.sol, p97, p97 QQ und siRNAs für VIMP, HERP, HRD1 oder Kontroll-siRNA transient transfiziert. **(B)** Die Spezifität der eingesetzten Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischen CTL wurde durch die exogene Zugabe von Melan-A<sub>26-35</sub>-Peptiden bzw. deren Abwesenheit zu Mel 91-Zellen verifiziert. Zur Kontrolle der HLA-A\*0201 Expression transfizierter Zellen wurden Mel 91-Zellen transient mit Vektor(-) transfiziert und in Gegenwart exogener Melan-A<sub>26-35</sub>-Peptide auf die Erkennung gegenüber Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischen CTL analysiert.

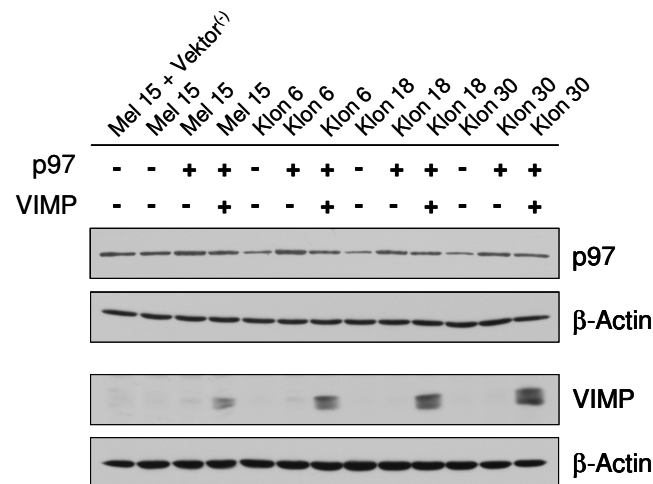
### 3.3.5 Rekonstitution der Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub>

Durch die Hemmung der Funktion oder der verminderten Expression spezifischer ERAD-Komponenten konnte gezeigt werden, dass die effiziente Präsentation des Epitops Melan-A<sub>26-35</sub> von der funktionellen Integrität des ERAD-Systems abhängt. Die CTL-resistenten Klone 6, 18 und 30, deren Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> defizient ist, wiesen in Relation zu der parentalen Zelllinie Mel 15 eine deutlich verminderte Expression der ERAD-Komponenten p97 und VIMP auf (siehe 3.3.3). In diesem Kontext wurde untersucht, ob die verminderte Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> der Klone durch die Transfektion korrespondierender Gene für p97 und VIMP rekonstituiert werden kann.

Mel 15-Zellen und die Klone 6, 18 und 30 wurden entweder transient mit einem Vektor kodierend für p97 oder in Kombination mit einem Vektor kodierend für VIMP transfiziert. Die Transfektionen von Mel 15-Zellen mit den jeweiligen Vektoren dienten der Analyse eines



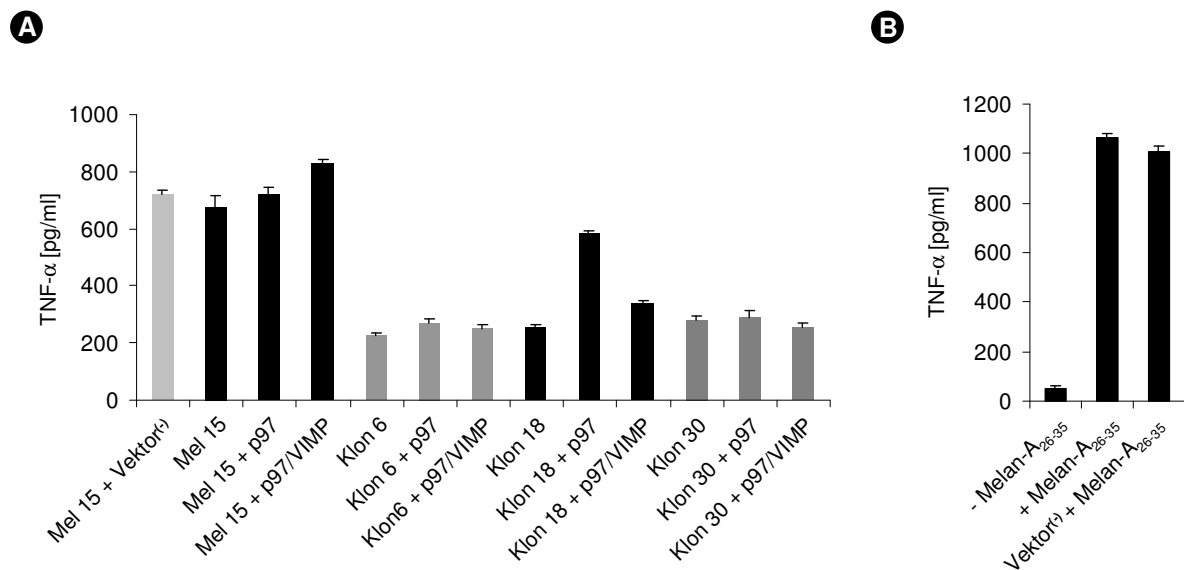
potenziellen Effektes, basierend auf der Überexpression der Proteine auf die Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub>. Die Expression von p97 und VIMP wurde mittels Immunoblotanalysen kontrolliert (**Abb. 36**). Es konnte eine Überexpression beider Proteine nach Transfektion korrespondierender Vektoren detektiert werden. Der Nachweis von VIMP in zwei Proteinbanden könnte auf eine partielle Modifikation des Proteins zurückzuführen sein.



**Abb. 36: Expressionskontrolle von p97 und VIMP.** Mel 15-Zellen und die selektionierten Klone 6, 18 und 30 wurden in den angegebenen Kombinationen mit Vektoren kodierend für p97 und VIMP transient transfiziert. Zur Kontrolle der Transfektion wurden Mel 15 transient mit Vektor<sup>(-)</sup> transfiziert. P97 und VIMP wurden durch Immunoblotanalysen der selektionierten Klone und Mel 15 nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde β-Actin detektiert.

Die Analyse der Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> mit Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischen CTL zeigte in den zur Kontrolle mit p97 transfizierten Mel 15-Zellen keine signifikanten Unterschiede in der Antigenpräsentation in Relation zu nicht transfizierten Mel 15-Zellen (**Abb. 37**). Die Effizienz der Epitoppräsentation war hingegen in gemeinsam mit p97 und VIMP transfizierten Mel 15-Zellen leicht erhöht. Im Gegensatz dazu war die Epitoppräsentation von Klon 18 nach Transfektion mit p97 massiv erhöht. Klon 6 und Klon 30 wiesen sowohl durch die alleinige Transfektion von p97 als auch durch die simultane Transfektion von p97 und VIMP keine Unterschiede im Niveau der Antigenpräsentation zu ihren nicht transfizierten Pendanten auf. Allerdings wies Klon 18 durch die parallele Transfektion mit p97 und VIMP nur eine leicht effizientere Präsentation des Epitops auf. Dieser Effekt weist auf einen inhibitorischen Einfluss basierend auf der Überexpression von VIMP hin. Ebenfalls wurde durch die alleinige Überexpression von VIMP in allen drei Klonen die Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> nicht gesteigert, sondern induzierte bei einer signifikanten Anzahl von Versuchswiederholungen (2 aus

n=4) sowohl bei Mel 15-Zellen als auch in den drei Klonen eine Reduktion der Epitopräsentation (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 37: Rekonstitution der Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub>.** Analyse der Epitopräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> mittels Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischen CTL über die Sekretion von TNF- $\alpha$ . E:T=1:1 **(A)** Mel 15-Zellen und die Klone 6, 18 und 30 wurden in den angegebenen Kombinationen mit Vektoren kodierend für p97 und VIMP transient transfiziert. Zur Kontrolle der Transfektion wurden Mel 15-Zellen transient mit Vektor(-) transfiziert. **(B)** Die Spezifität der eingesetzten Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischen CTL wurde durch die exogene Beladung von Mel 91-Zellen mit Melan-A<sub>26-35</sub>-Peptiden verifiziert. Zur Kontrolle der HLA-A\*0201-Expression transfizierter Zellen wurden Mel 91-Zellen transient mit Vektor(-) transfiziert.

Die Rekonstitution der Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> durch die Transfektion mit p97 in Klon 18 und der inhibitorische Effekt von überexprimierten VIMP weist darauf hin, dass die funktionelle Integrität des ERAD-Systems zur Retrotranslokation von Substraten und späteren Antigenpräsentation von Epitopen elementar von einer ausgewogenen Expression der ERAD-Komponenten abhängt. Die fehlgeschlagene Rekonstitution der Antigenpräsentation von Klon 6 und Klon 30 deutet, neben der genannten Dysbalance der Expression von ERAD-Komponenten, darauf, dass neben p97 und VIMP weitere Faktoren an der Präsentation des Epitops beteiligt sein müssen, deren Expression oder Funktion in den beiden Klonen defizient ist.

Die effiziente Präsentation des Melanom-assoziierten Epitops Melan-A<sub>26-35</sub> stellt einen kritischen Faktor zur Eliminierung von Melanomzellen durch die Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifische Immunüberwachung durch CTL dar. Neben Immunoproteasomen, intermediären Proteasomsubtypen und PA28 (siehe 3.2) konnte eine defiziente ER-assoziierte Degradation als Grundlage einer Immunevasion von Melanomzellen gegenüber Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischen CTL identifiziert werden.

## 4 DISKUSSION

Die Entwicklung von Tumoren ist ein multifaktorieller Prozess, in dem genetische Abnormalitäten wie Mutationen von Tumorsuppressorgenen, Onkogenen und Chromosomenaberrationen involviert sind. Epigenetische Veränderungen sind ebenfalls an dem Prozess der malignen Transformation beteiligt und führen, durch abnormale DNA-Methylierungen oder Histon-Modifikationen, zu veränderten Genexpressionen (Baylin und Ohm, 2006). Diese erhöhte genetische Variabilität ermöglicht Tumoren auf der einen Seite, die regulierte Gewebekomöostase durch die Aktivierung bzw. Inaktivierung relevanter Gene zu umgehen. Auf der anderen Seite entziehen sich Tumorzellen dem Immunsystem, beispielsweise durch die verminderte Expression von Genen, die obligat für die Erkennung und Eliminierung sind. Die Entwicklung immunevasiver Mechanismen fördert dabei nicht nur die Progression von Tumoren, sondern erschwert gleichfalls die Implementierung effektiver Immuntherapien. CTL sind in diesem Prozess die Haupteffektorzellen zur Eliminierung von Tumorzellen. Die Effektivität der CTL-Antwort basiert dabei im Wesentlichen auf der Interaktion zwischen CTL und Tumorzellen, die wiederum von der Quantität und Qualität spezifischer MHC Klasse I-Epitopkomplexe abhängt. Tumorzellen können multiple Mechanismen entwickeln, sich der CTL-Erkennung zu entziehen, indem sie die Aktivität und Vitalität von CTL beeinflussen und/oder die Präsentation von MHC Klasse I restringierten Epitopen auf ihren Zelloberflächen verändern können. Die Entwicklung von Immunevasionsmechanismen wird dabei durch den Selektionsdruck von CTL gefördert. In Folge dessen werden nicht immunevasive Tumorzellen eliminiert und Tumorzellen selektioniert, die ein erhöhtes Resistenzpotential aufweisen und der Immunüberwachung entgehen können (Dunn *et al.*, 2004). Es ist demnach von hoher Relevanz Immunevasionsmechanismen zu identifizieren, um geeignete Immuntherapien zu entwickeln bzw. zu optimieren, die verschiedenen Entwicklungsstadien von Tumoren angepasst sind und die Prognose betroffener Patienten verbessern können.

Für die Identifikation und Untersuchung von Immunevasionsmechanismen stellt das maligne Melanom einen bevorzugten Modelltumor dar, weil eine große Zahl von CTL, die für Melanom-assoziierte Epitope spezifisch sind, *in vivo* identifiziert wurden und mit spontanen Melanomregressionen in Zusammenhang gebracht wurden (Mackensen *et al.*, 1994). Darunter weist das Epitop Melan-A<sub>26-35</sub> in HLA-A\*0201<sup>+</sup> Individuen die häufigste Erkennung durch tumorinfiltrierende CTL auf. Basierend auf der Immundominanz des Epitops Melan-A<sub>26-35</sub> und der hohen Expression des Antigens Melan-A in über 90 % metastasierender Läsionen (Boon *et al.*, 2006) stellt das Epitop ein ideales Ziel immuntherapeutischer Strategien dar. Mit Bezug auf

dieses Modellsystem wurden in der vorliegenden Arbeit zwei unterschiedliche Immunevasionsmechanismen von Melanomzellen identifiziert, die eine Resistenz gegenüber Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischen CTL vermitteln können.

#### 4.1 Immunevasionsmechanismen

Die multiplen Mechanismen, die einzeln oder in Kombination die Resistenz gegenüber CTL vermitteln, lassen sich im Wesentlichen in zwei Gruppen unterteilen:

1. Mechanismen, die zu einer ineffizienten Präsentation von Antigenen durch Tumorzellen führen und dadurch eine verminderte Sensitivität gegenüber der CTL-vermittelten Cytolyse bedingen.
2. Mechanismen, die über die Expression von immunsuppressiven Molekülen oder proapoptotischen Signalen durch Tumorzellen zu einer verminderten Aktivität oder Vitalität von CTL führen.

Aberrante Expressionen und/oder Funktionen von Komponenten der Antigenpräsentation bzw. die Reduktion oder der Verlust der Expression des Antigens selbst führen zu einer verminderten Präsentation von Epitopen auf MHC Klasse I Molekülen. Diese Defekte in der Antigenpräsentation stehen im direkten Zusammenhang mit der Effektivität der CTL-Erkennung und folglich der Eliminierung von Tumorzellen (Seliger *et al.*, 2000).

Im Gegensatz dazu können immunsuppressive oder proapoptotische Moleküle eine Resistenz gegenüber der CTL-vermittelten Cytolyse bewirken, die Tumorzellen unbeeinflussbar von ihrer Antigenpräsentation und resistent gegenüber einer CTL-Erkennung machen. Beispielsweise kann über die Expression des immunmodulatorischen Cytokins TGF- $\beta$  die Cytotoxizität von CTL inhibiert werden (Thomas und Massague, 2005). Außerdem kann eine veränderte Expression von Rezeptoren oder Inhibitoren der Apoptosesignalkaskade (Stewart und Abrams, 2008) und die Expression von FasL (Rivoltini *et al.*, 2002) (siehe 1.3) zu einer Resistenz von Tumorzellen gegenüber der CTL-vermittelten Cytotoxizität führen. Ungeachtet einer effizienten Präsentation von Tumorepitopen ermöglichen diese Mechanismen eine Immunevasion.

Zur Identifikation von neuen Resistenzmechanismen, die auf einer defizitären Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> basieren, wurden mit spezifischen CTL kokultivierte cytolyseresistente Melanomzell-Klone selektioniert und bekannte Mechanismen, die eine Resistenz vermitteln können, ausgeschlossen. Der am häufigsten vorkommende

Resistenzmechanismus in diesem Kontext ist die verminderte Expression von MHC Klasse I Molekülen, der beim Melanom in 63 % der Fälle beobachtet wurde (Garrido und Algarra, 2001). Im Gegensatz dazu zeigten jedoch alle immunselektionierten Klone eine höhere Expression von HLA-A\*0201 Molekülen als die parentale Zelllinie Mel 15 auf der Zelloberfläche (3.3.1). Allerdings wiesen nach einer weiteren Wiederholung der Immunselektion mit CTL alle cytolyseresistenten Zellen eine verminderte Expression von HLA-A\*0201 auf, so dass sie von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen wurden (Daten nicht gezeigt). Dies demonstriert, dass der anhaltende Selektionsdruck durch CTL die Etablierung von MHC Klasse I Defekten begünstigt. Darüber hinaus wird dieser Befund durch die Beobachtung, dass die Häufigkeit von MHC Klasse I Aberrationen weitaus häufiger in Metastasen als in primären Tumoren auftritt, bestätigt (Marincola *et al.*, 2000). Das Immunsystem scheint demnach Evasionsvarianten zu selektionieren, deren im Vergleich zu primären Tumoren erhöhtes Resistenzpotential es ihnen unter anderem ermöglicht Metastasen zu bilden. Gestützt werden diese Hinweise zusätzlich durch Untersuchungen im Mausmodell. Ein MHC Klasse I negativer Tumorklon eines fibroblastischen Sarkoms führte in immunkompetenten Mäusen zur Entwicklung von MHC Klasse I negativen Metastasen (Garcia-Lora *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu bildete der gleiche Tumorklon in immundefizienten Mäusen MHC Klasse I positive Metastasen. Der Selektionsdruck des Immunsystems scheint demnach für die Selektion von Tumorzellen mit einem spezifischen MHC Klasse I Phänotyp verantwortlich zu sein. Basierend auf der hohen Expression von HLA-A\*0201 Molekülen in dem immunselektionierten Klon scheint dies kein Selektionsnachteil zu sein und weist auf die Etablierung von anderen Resistenzmechanismen als Selektionsvorteil gegenüber CTL hin. Dabei ist anzumerken, dass die Stimulierbarkeit von CTL bei den Klonen und Mel 15-Zellen durch die exogene Beladung von HLA-A\*0201 Molekülen mit Melan-A<sub>26-35</sub>-Peptiden vergleichbar war. D.h., dass die HLA-A\*0201 Moleküle auf den Zelloberflächen nicht limitierend zur maximalen CTL-Antwort sind (3.3.2.1). Demnach müssen Untersuchungen mit Vorsicht betrachtet werden, die sich allein auf die Expression von MHC Klasse I Molekülen in Tumorgewebe beschränken und dies mit der Progression von Tumoren in Zusammenhang bringen. Erst funktionelle Untersuchungen ermöglichen eine direkte Korrelation einer verminderten Expression von MHC Klasse I Molekülen mit einer reduzierten Antigenpräsentation, die möglicherweise die Basis einer Immunevasion sein kann.

Ein weiterer Resistenzmechanismus ist die verminderte Expression oder der Verlust von Tumor-assoziierten Antigenen, der ebenfalls durch CTL-vermittelten Selektionsdruck vermehrt auftritt (Lozupone *et al.*, 2003). Durch *in vitro* Untersuchungen von verschiedenen Melanomzelllinien, die heterogene Expressionen von Melan-A aber vergleichbare Expressionen von HLA-A\*0201

Molekülen aufweisen, konnte gezeigt werden, dass das Niveau der Expression dieser Antigene mit der Erkennung der Melanomzellen durch CTL korreliert (Cormier *et al.*, 1999). Besonders beim Melanom sind verminderte Expressionen von Differenzierungsantigenen zu beobachten (Rivoltini *et al.*, 2002). Die Expression des Differenzierungsantigens Melan-A wies in den immunselektierten Klonen eine heterogene Expression auf, wobei nur Klone im weiteren Verlauf untersucht wurden, die eine gleiche oder höhere Expression des Antigens zeigten (3.3.1, 3.3.2.2). Diese Beobachtung entspricht der Situation *in vivo*, in der die Expression von Melan-A und anderer Differenzierungsantigene ein extrem heterogenes Muster, sowohl in verschiedenen Melanomen, als auch innerhalb der gleichen Metastasen bzw. Läsionen aufweist (Marincola *et al.*, 2000). Dass die verminderte Expression von Differenzierungsantigenen beim Melanom häufiger in Erscheinung tritt als bei anderen Tumorentitäten, könnte an der physiologischen Rolle dieser Antigene liegen. Die Differenzierungsantigene des Melanoms bzw. der Melanozyten sind an der Biosynthese des Melanins beteiligt. Der Verlust oder die verminderte Expression der Differenzierungsantigene hat dadurch keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen, da sie nicht essentiell für die Zellhomöostase sind. Dies wird durch die erfolgreiche Etablierung Differenzierungsantigene-defizienter Melanomzellen belegt (Slingluff *et al.*, 2000).

Durch Analysen der Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> der immunselektierten Klone wurden die Klone 6, 18 und 30 identifiziert, deren Präsentation des Epitops im Vergleich zu parentalen Mel 15-Zellen drastisch reduziert ist (3.3.1). Sie wurden auf weitere bekannte Resistenzmechanismen untersucht, die neben einer Reduktion der HLA-A\*0201 und Melan-A Expression die Basis der drastisch verminderten Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> sein könnten. In diesem Zusammenhang weist die verminderte Expression der Untereinheiten des TAP-Transporters eine Häufigkeit von 56 % beim Melanom auf (Marincola *et al.*, 2000). Durch Mausmodelle TAP1 negativer Mäuse wurde demonstriert, dass ein defizienter TAP-Transporter zu einer reduzierten Expression von MHC Klasse I Molekülen auf der Zelloberfläche führt, da die Stabilisierung von MHC Klasse I Molekülen von der Beladung mit Peptiden abhängt (Van Kaer *et al.*, 1992). Aufgrund des TAP-abhängigen Transports des Epitops Melan-A<sub>26-35</sub> ins Lumen des ER (Ferry Ossendorp, persönliche Kommunikation) hätte eine verminderte Expression des TAP-Transporters einen Einfluss auf die Präsentation haben können, die jedoch ausgeschlossen werden konnte (3.3.2.3). Zwar wiesen einerseits die selektierten Klone keine verminderte Expression von HLA-A\*0201 Molekülen auf der Zelloberfläche auf, andererseits war eine verminderte Präsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> durch eine Reduktion der Expression von TAP-Untereinheiten nicht auszuschließen. Es sind mittlerweile eine Vielzahl von Epitopen identifiziert worden, die TAP-unabhängig präsentiert werden (Weinzierl *et al.*, 2008). Dadurch muss sich eine

Reduktion der Expression des TAP-Transporters nicht in jedem Fall auf die Menge von HLA-A\*0201 Molekülen auswirken, sondern würde von dem Ausmaß der Reduktion der TAP-Untereinheiten abhängen. *Vice versa* hätte hingegen eine Reduktion der Expression von TAP einen direkten Einfluss auf die Präsentation von Melan-A<sub>26-35</sub>.

Um zu untersuchen, ob die Cytolyseresistenz der selektierten Klone auf der massiv verminderten Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> basiert und nicht auf einer verminderten Sensitivität gegenüber der CTL-vermittelten Cytotoxizität, wurde die Cytolysesensitivität der Klone in Relation zu der parentalen Zelllinie Mel 15, mittels exogener Peptidbeladung von HLA-A\*0201 Molekülen, untersucht (3.3.2.4). Die CTL-vermittelte Cytolyse wird zum einen durch Rezeptor-abhängige Signalkaskaden wie Fas/FasL und zum anderen durch die Sekretion von Perforin/Granzym B induziert. Insbesondere wurde eine verminderte Expression des Fas-Rezeptors in Melanomen häufiger als in anderen Tumorentitäten beobachtet (Bullani *et al.*, 2002). Während in frühen Phasen der Tumorprogression die Fas/FasL-induzierte Apoptose aktiv ist, weisen Metastasen häufig eine Inhibition der Signalkaskade auf (Owen-Schaub *et al.*, 1998). Diese kann neben der verminderten Expression von Fas ebenfalls durch die Expression von Inhibitoren der Fas/FasL Signalkaskade wie cFLIP und FAP-1 vermittelt werden (Whiteside, 2002), die sich negativ auf die Aktivität von Caspase-8 auswirken (Ivanov *et al.*, 2003). Daneben kann die Perforin/Granzym B induzierte Apoptose durch die Expression von Serinproteaseinhibitoren wie PI-9/SPI-6 gehemmt werden, die zur Inaktivierung von Granzym B führt (Bots *et al.*, 2005). Die Lysierbarkeit der Klone 6, 18, 30 und Mel 15 durch CTL war vergleichbar, so dass eine verminderte Cytolysesensitivität ausgeschlossen werden konnte. Hingegen bietet die Resistenz gegenüber der CTL-induzierten Cytotoxizität eine Erklärung, warum viele der immunselektierten Klone ungeachtet einer effizienten Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> nicht durch CTL lysiert wurden (3.3.1).

## 4.2 Modulationen des UPS als Immunevasionsmechanismus

Einen elementaren Einfluss auf die Erkennung von Tumorzellen durch CTL besitzt das UPS, das für die Degradation und Prozessierung der meisten Antigene verantwortlich ist. Die Modulation des UPS steht dadurch in einem direkten Zusammenhang mit der Effizienz der Epitopräsentation und folglich der CTL-Erkennung und kann daher die Grundlage einer Immunevasion sein.

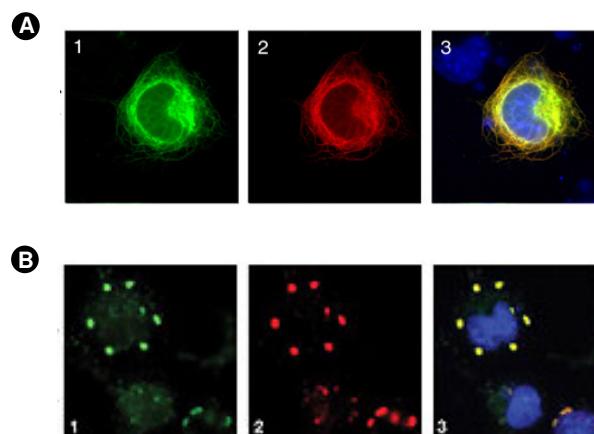
#### 4.2.1 Defekte der ER-assoziierten Degradation als Resistenzmechanismus

Zur Generierung und Präsentation von Proteinen des ER und sekretorischer Organellen müssen diese zur Prozessierung durch das Proteasom retrograd vom ER ins Cytosol transportiert werden. Die Abhängigkeit der Antigenprozessierung von der ER-assoziierte Degradation wurde initial für Hüllproteine von Viren, wie beispielsweise HIV-1 *envelope* und Hepatitis C Virus (HCV) *envelope glycoprotein* E1, beschrieben (Ferris *et al.*, 1999; Selby *et al.*, 1999). Melan-A ist zur Prozessierung und Generierung des Epitops Melan-A<sub>26-35</sub> ebenfalls auf das ERAD-System angewiesen. Dies konnte durch die Hemmung der Funktion und der verminderten Expression spezifischer ERAD-Komponenten demonstriert werden (3.3.4). Die proteasomale Degradation wird dabei im Wesentlichen durch die Ubiquitinierung von Melan-A durch die E3-Ligase HRD1 initiiert, deren verminderte Expression zu einer drastischen Reduktion der Präsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> führte sowie eine Stabilisierung von Melan-A zur Folge hat (Melanie Kny, persönliche Kommunikation). Als Grund für die defiziente Antigenpräsentation der Klone 6, 18 und 30 konnten bekannte Resistenzmechanismen, die mit einer ineffizienten Präsentation von Epitopen im Zusammenhang stehen sowie ein wesentlicher Einfluss proteasomaler Immununtereinheiten, ausgeschlossen werden (3.3.2.5, 3.3.2.6). Angesichts der direkten Korrelation der drastisch verminderten Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> mit der Hemmung der Funktion oder verminderten Expression einzelner ERAD-Komponenten, wurde als Basis der Resistenz der selektierten Klone die drastisch verminderte Expression von p97 und VIMP identifiziert (3.3.3). Es konnte demnach zum ersten Mal ein defizitäres ERAD-System als Grundlage einer Immunevasion von Tumorzellen gezeigt werden. Bisher war nur bei Viren bekannt, dass sie das ERAD-System als Immunevasionsmechanismus nutzen, obwohl der Mechanismus sich wesentlich von dem in dieser Arbeit dargestellten durch Melanomzellen unterscheidet. Das humane Cytomegalovirus (HCMV) kodiert für die Proteine US2 und US11, die MHC Klasse I HC zur Degradation durch das UPS dirigieren (Loureiro und Ploegh, 2006). Die viralen Proteine induzieren dabei die Retrotranslokation MHC Klasse I HC aus dem ER über ERAD ins Cytosol, wo sie durch das Proteasom abgebaut werden. Dies führt zu einer verminderten Expression von MHC Klasse I Molekülen und folglich zu einer reduzierten Präsentation von viralen Epitopen und der Erkennung durch CTL.

Durch die Reexpression von p97 wurde das defizitäre ERAD-System der Klone als Basis der Resistenz gegenüber Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischen CTL verifiziert (3.3.5). Allerdings konnte die Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> der Klone 6 und 30, sowohl durch die Überexpression von p97 alleine, als auch durch die gleichzeitige Überexpression von p97 und VIMP nicht



rekonstituiert werden. Ebenfalls hatte die kombinierte Überexpression von p97/VIMP keinen Effekt auf die Antigenpräsentation des Klon 18, obwohl durch die alleinige Überexpression von p97 diese rekonstituiert werden konnte. Dies weist auf einen inhibitorischen Effekt des überexprimierten VIMP auf die funktionelle Integrität des ERAD-Systems in den Klonen hin, der den Abbau von Melan-A und damit die Präsentation des Epitops vermindert. Ye *et al.* zeigten, dass die Überexpression von VIMP in COS-Zellen zu einer Veränderung der ER-Morphologie und zur Ausbildung von langen Filamenten führen kann (Ye *et al.*, 2004) (**Abb. 38A**). Darüber hinaus kann die kombinierte Überexpression von p97 und VIMP die Kolokalisation beider Proteine in großen punktförmigen Strukturen um den Nukleus induzieren (**Abb. 38B**). Es ist demnach wahrscheinlich, dass die Überexpression von VIMP einzeln oder in Kombination mit p97 in den Klonen beide Proteine ihrer Funktion innerhalb der ER-assoziierten Degradation entzieht.



**Abb. 38: Immunfluoreszenzaufnahmen von überexprimierten VIMP und VIMP/p97.** (A) Nachweis von VIMP (1), ATF6 als ER-Marker (2) und Kolokalisation beider Proteine (3) nach Überexpression von VIMP in COS Zellen. (B) Nachweis von p97 (1), VIMP (2) und Kolokalisation beider Proteine mit Anfärbung des Zellkerns durch DAPI (3) nach der Überexpression von p97 und VIMP in COS-Zellen. (Ye *et al.*, 2004).

Basierend auf dem inhibitorischen Effekt von überexprimierten VIMP und unter Berücksichtigung der veränderten ER-Morphologie scheint es, dass die funktionelle Integrität des ERAD-Systems von spezifischen molaren Verhältnissen der ERAD-Komponenten abhängt. Zusätzlich weist die fehlgeschlagene Rekonstitution der Antigenpräsentation der Klone 6 und 30 auf eine direkte oder indirekte Beteiligung weiterer Faktoren der ER-assoziierten Degradation hin, die eine aberrante Expression und/oder Funktion in den Klonen besitzen und dadurch mit der Effizienz der Antigenpräsentation interferieren. AKT/PKB (Proteinkinase B) ist an der Regulation zellulärer Prozesse wie Proliferation, Apoptose und genomischer Stabilität beteiligt und ist in Tumoren häufig erhöht exprimiert (Altomare und Testa, 2005). Die Deregulation von

AKT in Tumoren kann zu einer erhöhten Apoptoseresistenz führen und durch die induzierte Sekretion von Matrixmetalloproteasen zur Tumorinvasion und Metastasenbildung beitragen (Thant *et al.*, 2000). Klein *et al.* zeigten, dass p97 ein Substrat von AKT ist und p97 phosphoryliert (Klein *et al.*, 2005). Während unphosphoryliertes p97 mit ubiquitinierten Substraten interagierte, war die Assoziation nach Phosphorylierung durch AKT inhibiert. Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass dies ein Mechanismus sein könnte, wie ubiquitinierte Substrate von p97 zur proteasomalen Degradation freigesetzt werden. In Bezug auf die defiziente Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> in den untersuchten Klonen, könnte AKT in Folge der Tumorprogression induziert sein, was zu einer inhibierten Assoziation von p97 mit ubiquitinierten Melan-A führen würde. In Folge dessen würde Melan-A vermindert abgebaut werden, da das Protein entweder nicht effizient aus der ER-Membran transloziert oder adäquat dem Proteasom zugeführt werden kann, und eine Reduktion der Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-36</sub> induzieren.

Der identifizierte Evasionsmechanismus von Melanomzellen, deren Resistenz gegenüber Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischen CTL auf einer defizienten ER-assoziierten Degradation beruht, hat nicht nur Implikationen auf die CTL-Erkennung des Epitops Melan-A<sub>26-35</sub>. Es ist wahrscheinlich, dass ebenfalls die Präsentation anderer Epitope des Melanoms und weiterer Tumorentitäten, die aus den im ER lokalisierten Proteinen stammen und dementsprechend zur proteasomalen Generierung über ERAD abgebaut werden, betroffen sind. Im Fall des malignen Melanoms ist bei einer defizienten ER-assoziierten Degradation wahrscheinlich ebenfalls die Präsentation von Epitopen weiterer Differenzierungsantigene betroffen. Für Tyrosinase wurde bereits gezeigt, dass das Antigen über ERAD abgebaut wird (Halaban *et al.*, 1997). Es ist demnach wahrscheinlich, dass weitere Differenzierungsantigene, die eine ER-Lokalisation aufweisen, gleichermaßen über ERAD degradiert werden. Der Selektionsdruck von CTL, die gegen Melan-A<sub>26-35</sub> gerichtet sind, würde demnach nicht nur zur Etablierung von Tumorzellen führen, die eine Resistenz gegenüber Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifische CTL entwickelt haben, sondern parallel zur Resistenz gegen CTL, die Epitope aller bisher bekannten Differenzierungsantigene des Melanoms betreffen. Ein defizientes ERAD-System scheint demnach ein äußerst effektiver Immunevasionsmechanismus gegenüber der Erkennung durch Melanom-spezifische CTL zu sein.

#### 4.2.2 Die Modulation der Generierung von Melan-A<sub>26-35</sub> durch IMP und IP

Durch die Exposition von Melanomzellen mit INF $\gamma$  wurde beobachtet, dass die Präsentation des Epitops Melan-A<sub>26-35</sub> drastisch reduziert ist und dies zur Immunevasion gegenüber CTL führen kann. Durch *in vitro* Prozessierungsexperimente wurde die Reduktion der Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> mit einer verminderten Generierung durch IP korreliert (Chapatte *et al.*, 2006; Morel *et al.*, 2000). Der genaue Mechanismus wurde in den Untersuchungen hingegen nicht geklärt, noch wurde die Rolle von verschiedenen IMP und PA28 untersucht. Darauf aufbauend wurden in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal differenzierte Analysen der Epitopgenerierung eines Tumorepitops durch IMP durchgeführt, während sonst lediglich die Generierung durch SP und IP untersucht wurde.

Anhand von Antigenpräsentationsanalysen und *in vitro* Prozessierungsexperimenten wurde gezeigt, dass der Einbau von Immunountereinheiten zu einer verminderten Generierung von Melan-A<sub>26-35</sub> und damit zur Immunevasion gegenüber CTL führen kann (3.2.2.1, 3.2.2.2). Insbesondere  $\beta$ 1i und/oder  $\beta$ 2i beinhaltende Proteasomen wiesen eine drastisch reduzierte Generierung des Epitops auf, während dieser Effekt bei IMP <sup>$\beta$ 5i</sup> in geringerer Intensität ausgeprägt war.

Der negative Effekt der Immunountereinheiten war ungeachtet unterschiedlicher Einbaueffizienzen dominant ausgeprägt, was eine funktionelle Dominanz von Immunountereinheiten gegenüber konstitutiven Untereinheiten impliziert (3.2.2.1, 3.2.2.2). Sijts *et al.* und Strehl *et al.* beobachteten schon bei einer niedrigen Expression von Immunountereinheiten ebenfalls einen dominierenden Effekt auf die Epitopgenerierung (Sijts *et al.*, 2000; Strehl *et al.*, 2006). Die Antigenpräsentation von Epitopen kann demnach selbst bei niedriger Expression von Immunountereinheiten deutlich durch diese beeinflusst werden.

Einen Einfluss auf die Generierung von Melan-A<sub>26-35</sub> könnten die unterschiedlichen Substrathydrolyseraten der Proteasomsubtypen bewirken, die deutlich bei IMP <sup>$\beta$ 1i+ $\beta$ 2i</sup> und IP gesteigert waren (3.2.2.2). Erhöhte Hydrolyseraten von IP wurden auch in anderen Arbeiten bei der Degradation von Modellsubstraten beobachtet (Boes *et al.*, 1994; Cardozo und Kohanski, 1998; Kuckelkorn *et al.*, 1995; Peters *et al.*, 2002). Die Differenzierungen zwischen Proteasomen, die Immunountereinheiten einzeln und in Kombination exprimieren, weisen darauf hin, dass die Kombination von  $\beta$ 1i und  $\beta$ 2i in Proteasomen eine erhöhte Hydrolyserate determiniert. Dennoch scheinen die unterschiedlichen Substrathydrolyseraten nicht in einem direkten Zusammenhang mit der Generierung des Epitops zu stehen, da die erhöhten Substrathydrolyseraten von IMP <sup>$\beta$ 1i+ $\beta$ 2i</sup>

und IP nicht zu einer verbesserten Generierung des Epitops beitragen. Luciani *et al.* postulieren, dass die erhöhte Hydrolyserate auf einer vergrößerten Öffnung des *gates* basiert (Luciani *et al.*, 2005) und stützen sich dabei auf Studien, die zeigen, dass der Ein- und Austritt von Substraten in das Proteasom der limitierende Schritt in der Hydrolyse von Substraten ist (Groll *et al.*, 2000; Kohler *et al.*, 2001; Nussbaum *et al.*, 1998). Bei einer größeren Öffnung des *gates* würden demnach mehr Peptide Zugang zur katalytischen Kavität bekommen und damit zu einer erhöhten Hydrolyserate führen. Allerdings hätte eine vergrößerte Öffnung des *gates* ebenfalls eine maßgebliche Auswirkung auf die Retentionszeit von Substraten innerhalb des Proteasoms, die deutlich kürzer wäre und zum Austritt von längeren Fragmenten führen würde als bei einer kleineren Öffnung. Bei einer Limitierung des Ein- oder Austritts von Peptiden in das Proteasom ist die Retentionszeit lang und Fragmente würden wiederholt in kleinere Produkte prozessiert. Würde demnach die erhöhte Hydrolyserate von IP und  $\text{IMP}^{\beta 1i+\beta 2i}$  auf einer größeren Öffnung des *gates* basieren, müssten im Vergleich zu den übrigen Proteasomsubtypen aufgrund der kürzeren Retentionszeit die Länge der generierten Fragmente zunehmen. Die Analyse der in den *in vitro* Prozessierungsexperimenten generierten Fragmente durch IP und  $\text{IMP}^{\beta 1i+\beta 2i}$  zeigte hingegen keine höheren Mengen an längeren Prozessierungsprodukten, als die der übrigen Proteasomsubtypen (3.2.2.2 und Daten nicht gezeigt). Vielmehr scheinen die Unterschiede des katalytischen Profils der verschiedenen Proteasomsubtypen die Substrathydrolyserate zu determinieren. Die Wahrscheinlichkeit der Proteolyse ist abhängig von der Verweildauer des Substrats am katalytischen Zentrum, die wiederum von der Affinität des Substrats zu den Bindungstaschen abhängt (Groll *et al.*, 2005). Basierend auf den unterschiedlichen katalytischen Profilen der Proteasomsubtypen (Klare *et al.*, 2007) (3.2.2.2) durch die Inkorporation verschiedener Kombinationen an Immununtereinheiten, ist die Affinität des Substrats zu den Bindungstaschen der verschiedenen Proteasomsubtypen unterschiedlich beeinflusst. Dies würde sowohl die erhöhte Hydrolyserate von IP und  $\text{IMP}^{\beta 1i+\beta 2i}$  bezüglich des Modellsubstrats erklären, als auch die Unterschiede der Substrathydrolyseraten der übrigen Proteasomsubtypen. Einen weiteren Hinweis darauf bietet die Beobachtung, dass die Hydrolyserate von SP und IP bei denaturierten ganzen Proteinen *in vitro* keine Unterschiede aufweist (Cascio *et al.*, 2001; Toes *et al.*, 2001). Die Hydrolyserate scheint daher eher von der Sequenz der gewählten Modellsubstrate abzuhängen.

Die verminderte Generierung und in Folge dessen Präsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> durch die verschiedenen IMP und des IP, ist auf die Reduktion der exakten N-terminalen Schnitte zur Generierung des Epitops zurückzuführen, denn die Präferenz des C-terminalen Schnittes war bei allen Proteasomsubtypen dominant ausgeprägt (3.2.2.1, 3.2.2.2). Dies steht im Gegensatz zu der Interpretation von Chapatte *et al.*, die als einzige bisher die Generierung von Melan-A<sub>26-35</sub> durch

IMP<sup>β5i</sup> und IP verglichen haben. Die Autoren postulieren, dass die drastisch verminderte Generierung von Melan-A<sub>26-35</sub> durch IP auf eine verminderte Prozessierung des C-Terminus des Epitops zurückzuführen ist (Chapatte *et al.*, 2006). Für die Untersuchung wurden isolierte Proteasomen aus murinen dendritischen Zellen, die konstitutiv IP exprimieren, und Proteasomen aus dendritischen Zellen β1i defizienter Mäuse (β1i<sup>-/-</sup>), die β5i als einzige Immunountereinheit in Proteasomen einbauen, genutzt. Für die *in vitro* Prozessierungsexperimente wurde das gleiche Modellsubstrat verwendet wie in der vorliegenden Arbeit, aber es wurde nur ein *Precursor*-Epitop (Melan-A<sub>15-35</sub>) nachgewiesen, dessen C-Terminus durch IP ineffizienter generiert wurde als durch IMP<sup>β5i</sup>. Durch den mangelnden Nachweis des exakten Epitops und der fehlenden Differenzierung zwischen verschiedenen Proteasomsubtypen war es den Autoren nicht möglich, die Rolle exakter N-terminaler Schnitte bei der Präsentation und Generierung des Epitop zu analysieren. Die verminderte Prozessierung des C-Terminus von Melan-A<sub>26-35</sub> bzw. des *Precursor*-Epitops Melan-A<sub>15-35</sub> durch IP wurde zwar gleichermaßen in der vorliegenden Arbeit bestätigt, allerdings waren die C-terminalen Schnitte, im Gegensatz zu exakten N-terminalen Schnitt, nicht limitierend, was insbesondere im Vergleich mit den verschiedenen IMP deutlich wird (3.2.2.2).

Häufig werden Epitope als N-terminale *Precursor* durch das Proteasom generiert, die durch Aminopeptidasen zur richtigen Länge für die Beladung auf MHC Klasse I Moleküle prozessiert werden können (Rock *et al.*, 2004). Beispielsweise verstärkt ERAP1, eine Aminopeptidase im ER, die Prozessierung eines *Precursor*-Epitops von Ovalbumin und führt zur effizienteren Präsentation des Epitops (Saric *et al.*, 2002). Im Fall von Melan-A weisen hingegen die *in vitro* Prozessierungsexperimente und Antigenpräsentationsanalysen darauf hin, dass Melan-A<sub>26-35</sub>-Epitope, die direkt durch das Proteasom generiert werden, präferiert auf HLA-A\*0201 Molekülen präsentiert werden. Im Vergleich zu SP induzierten auch höhere Mengen von *Precursor*-Epitopen bei IMP<sup>β1i</sup> und IMP<sup>β1i+β2i</sup> keine verbesserte Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> (3.2.2.1, 3.2.2.2). Ähnliche Beobachtungen machten Chapatte *et al.*, als sie mittels Plasmidvektoren verschiedene *Precursor*-Epitope von Melan-A<sub>26-35</sub> bzw. das Epitop in Zellen exprimierten und die Erkennung des Epitops durch spezifische CTL untersuchten (Chapatte *et al.*, 2004). Die Effizienz der Präsentation wurde mit antigenen Peptiden verglichen, die ausschließlich durch das Proteasom prozessiert werden und solchen, die einer weiteren N-terminalen Prozessierung bedürfen, um präsentiert zu werden. Es zeigte sich, dass Zellen, die *Precursor*-Epitope von Melan-A<sub>26-35</sub> exprimierten, wesentlich geringer durch CTL erkannt wurden als solche, die das Epitop exprimierten. Eine mögliche Erklärung wäre eine unzureichende Prozessierung der N-terminal verlängerten Sequenz des Epitops durch Aminopeptidasen. Ein Einfluss der N-terminal verlängerten Sequenz von Epitopen auf deren Prozessierung durch

Aminopeptidasen wurde anhand des Vergleichs der Präsentation des immundominanten Epitops von Ovalbumin mit einem subdominanten Epitop demonstriert (Mo *et al.*, 2000). Durch den reziproken Austausch der N-terminal flankierenden Sequenzen von *Precursor*-Epitopen der beiden Epitope wurde unter Inhibition des Proteasoms die Subdominanz auf das vorher immundominante Epitop übertragen. Die N-terminal flankierende Sequenz des subdominanten Epitops führte demnach zu einer ineffizienten Prozessierung und damit Präsentation des Epitops.

Alternativ wäre auch denkbar, dass Melan-A<sub>26-35</sub>-*Precursor*-Epitope eine erhöhte Sensitivität für Peptidasen aufweisen, die eine Zerstörung der Epitopsequenz zu Folge haben könnte. Beispielsweise ist die cytosolische Peptidase *thimet oligopeptidase* (THOP) ein limitierender Faktor in der Präsentation einiger Antigene (York *et al.*, 2003). Durch die verminderte Expression der Peptidase zeigte sich eine deutlich verstärkte Antigenpräsentation, die zu einer erhöhten Expression von MHC Klasse I Molekülen auf den Zelloberflächen führte.

Der Mechanismus, dem die verminderte Generierung von Melan-A<sub>26-35</sub> durch IP zu Grunde liegt, unterscheidet sich dabei elementar von dem der anderen bekannten Epitope, die durch IP ineffizient generiert werden. Für die verschiedenen IMP können dagegen keine Vergleiche gezogen werden, da wie bereits erwähnt, in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal detaillierte Analysen der Generierung eines Epitops durch IMP durchgeführt wurden. Im Gegensatz zu der ineffizienten Prozessierung des exakten N-Terminus von Melan-A<sub>26-35</sub> durch IP werden die Epitope gp100<sub>209-217</sub>, Tyrosinase<sub>369-377</sub>, RU1<sub>34-42</sub>, das aus einem ubiquitär exprimierten Protein stammt, und ein Epitop des lymphozytären Choriomeningitis-Virus (gp<sub>276-286</sub>), allesamt durch IP verstärkt innerhalb der Epitopsequenz geschnitten und damit zerstört (Basler *et al.*, 2004; Chapiro *et al.*, 2006; Morel *et al.*, 2000).

Die Unterschiede der Generierung von Epitopen beruhen dabei auf den definierten katalytischen Aktivitäten des Proteasoms, die auf der Schnittpräferenz nach der ersten Aminosäure N-terminal vor der Schnittstelle (P1) basieren (Harris *et al.*, 2001). In Folge dessen ist für die verminderte Prozessierung des exakten N-Terminus von Melan-A<sub>26-35</sub> eine Reduktion der PGPH Aktivität (Schnitt nach der sauren Aminosäure Glu<sup>25</sup>) von IMP und IP verantwortlich (3.2.2.2). Unterschiede in der Präferenz für Schnitte innerhalb der Epitopsequenz von Melan-A<sub>26-35</sub> und zur Generierung des C-Terminus basieren hingegen aufgrund der hydrophoben Sequenz auf Veränderungen der ChT-L Aktivität. Während den konstitutiven Untereinheiten  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 und  $\beta$ 5 mittels fluorogenen Substraten distinkte katalytische Aktivitäten zugeordnet werden konnten ( $\beta$ 1: PGPH,  $\beta$ 2: T-L,  $\beta$ 5: ChT-L), sind bei der Substitution mit den homologen

Immunountereinheiten einzig bei der Immunountereinheit  $\beta 1i$  konforme Angaben in der Literatur bezüglich der Veränderungen der katalytischen Aktivitäten durch die Substitution von  $\beta 1$  durch  $\beta 1i$  beschrieben (Orlowski und Wilk, 2000). Viele dieser Experimente basieren auf Extrakten INF $\gamma$ -exponierter Zellen, was zu einem unterschiedlichen Grad des Einbaus von Immunountereinheiten und damit zur Bildung von IMP führen kann. Dies könnte eine Erklärung für die unterschiedlichen Angaben in der Literatur sein. Hingegen zeigen Strukturmodelle bei der theoretischen Substitution von  $\beta 1$  durch  $\beta 1i$ , dass die  $\beta 1i$ -S1-Tasche einen apolareren Charakter besitzt als die S1-Tasche von  $\beta 1$  und dadurch wahrscheinlich die Reduktion der PGPH Aktivität bewirkt (Groll *et al.*, 1997; Unno *et al.*, 2002). Dies könnte ein Grund sein, warum  $\beta 1i$  beinhaltenden Proteasomen den exakten N-Terminus des Epitops nur ineffizient prozessieren. Darüber hinaus wird die S1-Tasche von  $\beta 1i$  nicht nur von  $\beta 1i$  selbst, sondern ebenfalls durch  $\beta 2i$  gebildet, was sie von den S1-Taschen von  $\beta 5i$  und  $\beta 2i$  unterscheidet. Diese sind neben  $\beta 5i$  und  $\beta 2i$  durch nicht-katalytische, d.h. nicht austauschbare  $\beta$ -Untereinheiten aufgebaut (Groll *et al.*, 1997; Unno *et al.*, 2002). Analog gilt dies ebenfalls für die S1-Taschen der korrespondierenden konstitutiven Untereinheiten. Demzufolge wäre es möglich, dass die Substitution von  $\beta 2$  durch  $\beta 2i$  Auswirkungen auf die Flexibilität und Größe der S1-Tasche von  $\beta 1$  (bzw.  $\beta 1i$ ) hat. Dies könnte ebenfalls bei Proteasomen des Typs IMP $^{\beta 2i}$  und IMP $^{\beta 5i+\beta 2i}$  zu einer Reduktion der PGPH Aktivität und damit unzureichenden Prozessierung des exakten N-Terminus von Melan-A $_{26-35}$  führen (3.2.2.2). Strukturmodelle des 20S Proteasoms des Rindes zeigen zwar keine grundlegenden Änderungen in den Anordnungen und Spezifitäten der S1-Taschen durch die Substitution von  $\beta 2$  mit  $\beta 2i$ , allerdings basieren diese allein auf Vorhersagen, da IP bisher nicht kristallisiert werden konnten (Unno *et al.*, 2002).

Dieses Modell könnte zwar eine Erklärung für die verminderte Prozessierung des N-Terminus von Melan-A $_{26-35}$  durch  $\beta 1i$  und/oder  $\beta 2i$  beinhaltende Proteasomen bieten, ist aber nicht hinreichend für eine Erklärung der verminderten Prozessierung des N-Terminus durch IMP $^{\beta 5i}$ . Ebenfalls sind die unterschiedlichen ChT-L Aktivitäten der einzelnen Proteasomsubtypen mit diesem Modell nicht konform (3.2.2.2). Unter Berücksichtigung, dass die direkte Korrelation der katalytischen Aktivitäten des Proteasoms mit den katalytischen Zentren einzelner Untereinheiten bei längeren Substraten weniger genau definiert ist als bei kurzen fluorogenen (Kloetzel, 2004) (siehe 1.1.1) erscheint dies eine Simplifizierung der natürlichen Bedingungen zu sein. Die unterschiedlichen Spezifitäten einzelner Untereinheiten reflektieren vielmehr die physiologischen Beschränkungen der lokalen Struktur um die aktiven Zentren, als eine stringente Selektivität für Aminosäuren in der Position P1 von Substraten (Groll und Huber, 2003). Die Substratbindungskanäle, die sich neben den S1-Taschen durch weitere spezifische

Substratbindungstaschen auszeichnen, sind ebenfalls am proteolytischen Prozess involviert. Indem sie an der Stabilisierung von Peptiden in den Substratbindungskanälen beteiligt sind, determinieren sie, neben den S1-Taschen der katalytischen Zentren, die Wahrscheinlichkeit einer möglichen Proteolyse und folglich der auftretenden Schnittpräferenz (Borissenko und Groll, 2007). Dies erklärt, warum ebenfalls die flankierenden Sequenzen um eine Schnittstelle herum deren Selektion beeinflussen (Harris *et al.*, 2001; Nussbaum *et al.*, 1998; Toes *et al.*, 2001). Basierend auf diesen Erkenntnissen wäre es möglich, dass der Einbau von Immununtereinheiten strukturelle Veränderungen des Proteasoms induziert, die sich allosterisch auf Untereinheiten auswirken und zu Veränderungen der Substratbindungskanäle führen. Dieses Modell könnte, zusätzlich zu der verminderten PGPH Aktivität von  $\beta 1i$  und/oder  $\beta 2i$  beinhaltenden Proteasomen des vorher erörterten Modells, sowohl die Reduktion der PGPH Aktivität von  $IMP^{\beta 5i}$  erklären, als auch die drastische Reduktion der ChT-L Aktivität von  $\beta 1i$  und/oder  $\beta 2i$  beinhaltenden Proteasomen bei gleichzeitigem Einbau von  $\beta 5i$  (3.2.2.2). Neben den in der Einleitung beschriebenen Hinweisen auf allosterische Effekte innerhalb des Proteasoms (1.1.1), zeigen Osmulski und Gaczynska Rasterkraftmikroskopieaufnahmen von 20S Proteasomen unter nativen Bedingungen, die zwischen einem Fass- und einem Zylinder-förmigen Konformationszustand wechseln, dessen Gleichgewicht bei der Proteolyse von Substraten zu der Zylinder-ähnlichen Form verschoben ist (Osmulski und Gaczynska, 2000; Osmulski und Gaczynska, 2002). Diese Untersuchungen weisen darauf hin, dass allosterische Veränderungen eine Rolle bei der Degradation bzw. Prozessierung durch das Proteasom spielen.

Ebenfalls scheint der Einbau von Immununtereinheiten zu strukturellen Veränderungen des 20S Proteasoms zu führen, die einen Einfluss auf die Schnittpräferenz ausüben können. Die strukturelle Rolle von Immununtereinheiten wurde durch Untersuchungen der Prozessierung von Epitopen durch Proteasomen deutlich, in denen Immununtereinheiten durch mutierte katalytisch inaktive ausgetauscht wurden (Schmidtke *et al.*, 1998; Sijts *et al.*, 2000). Sijts *et al.* zeigten, dass die Generierung eines Epitops des Hepatitis B Virus (HBV) Core Antigens durch IP drastisch gesteigert ist (Sijts *et al.*, 2000). Die effiziente Generierung war dabei nicht durch die Substitution von  $\beta 5i$  durch eine katalytisch inaktive  $\beta 5i$  Mutante vermindert. Demgegenüber wiesen  $IMP^{\beta 1i+\beta 2i}$  eine drastisch reduzierte Epitopgenerierung auf. Während die katalytische Aktivität von  $\beta 5i$  keinen Einfluss auf die Generierung des HBV-Epitops hatte, scheint der Einbau dieser Immununtereinheit strukturelle Veränderungen induziert zu haben, die zu einem veränderten Schnittverhalten führten. Die effiziente Generierung und Präsentation des Epitops Melan-A<sub>26-35</sub> basiert demnach auf der funktionellen und strukturellen Kooperativität der Untereinheiten von SP bzw. zu einem geringeren Anteil von  $IMP^{\beta 5i}$ .



In Relation zu den anderen bekannten Epitopen, die durch IP ineffizient generiert werden und durch bevorzugte Schnitte innerhalb der Epitopsequenz zerstört werden, weist die Aminosäuresequenz von Melan-A<sub>26-35</sub> und der flankierenden Sequenzen signifikante Unterschiede auf. Das Epitop ist mit Ausnahme von Glu<sup>26</sup> in die Transmembrandomäne des Proteins eingebettet. Dadurch ist zum einen die Hydrophobizität des Epitops um ein wesentliches höher als das anderer Epitope, die in cytosolischen oder ER-luminalen Domänen lokalisiert sind, und zum anderen stellt der N-Terminus des Epitops die Zweigstelle zwischen der hydrophilen N-terminal flankierenden und der fast ausschließlich hydrophoben Sequenz des Epitops dar. Diese besonderen Merkmale könnten die Erklärung des elementar unterschiedlichen Schnittverhaltens bieten, die Melan-A<sub>26-35</sub> nicht nur von den bereits beschriebenen Epitopen, die durch IP ineffizient generiert werden, sondern ebenfalls von den hauptsächlich viralen Epitopen, die aufgrund der effizienteren Prozessierung des C-Terminus durch IP besser generiert werden, unterscheidet (Kloetzel, 2004). Bisher ist Melan-A<sub>26-35</sub> das erste Epitop, das in einer Transmembrandomäne lokalisiert ist und dessen Generierungseffizienz durch verschiedene Proteasomsubtypen verglichen wurde.

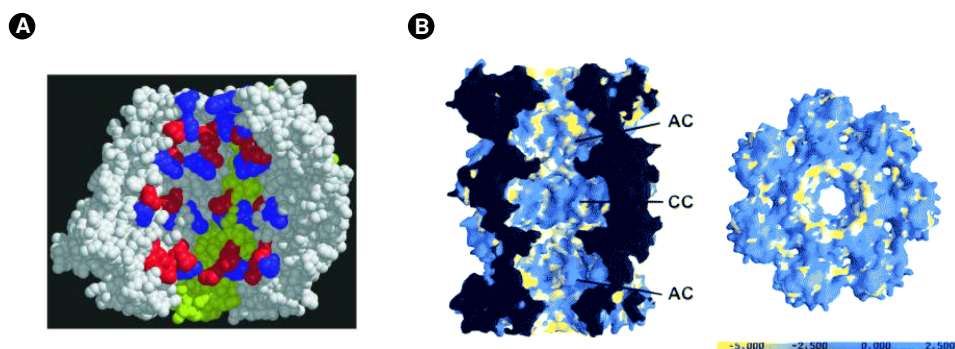
#### 4.2.3 Die Modulation der Generierung von Melan-A<sub>26-35</sub> durch PA28

Bei den bisher untersuchten Epitopen hatte PA28 entweder keinen Einfluss auf die Generierung, ermöglichte diese erst, oder führte zu einer verbesserten Generierung (Kloetzel, 2004; Sun *et al.*, 2002; Textoris-Taube *et al.*, 2007). Die Generierung und Präsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> war sowohl durch SP als auch IP in Anwesenheit von PA28 deutlich vermindert (3.2.3.1, 3.2.3.2). Melan-A<sub>26-35</sub> ist somit das erste bekannte Epitop, dessen Generierungseffizienz durch PA28 reduziert wird. Für die Analysen der Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> in Gegenwart von PA28 wurde PA28 $\alpha$ /PA28 $\beta$  in Zellen überexprimiert. Mögliche Folgen der Überexpression von PA28, die zu einer Kompetition von überexprimierten PA28 mit dem 19S Regulator führen könnten, wurden durch die Quantifizierung polyubiquitinerter Proteine ausgeschlossen (3.2.3.1). Würden aufgrund der hohen Menge von PA28 durch die Überexpression die Menge an 19S-20S (bzw. 19S-20S-PA28) Proteasomen reduziert und vermehrt PA28-20S (bzw. PA28-20S-PA28) Proteasomen in der Zelle vorliegen, wäre der Abbau polyubiquitinerter Proteine betroffen, die akkumulieren würden. Basierend auf der über Polyubiquitin vermittelten proteasomalen Degradation von Melan-A (Levy *et al.*, 2005) könnte dies zu einer reduzierten Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> führen. Es scheint, dass die Bindung des 19S Regulators am 20S Proteasom selbst durch hohe Mengen PA28 nicht beeinflusst wird. Cascio *et al.*

demonstrierten durch *in vitro* Rekonstitutionsversuche von Hybridproteasomen (19S-20S-PA28), dass bei einem großen Überschuss von PA28 zwar die Menge an 26S Proteasomen (19S-20S) ab- und die Menge an Hybridproteasomen zunimmt, doch konnte keine Assemblierung von PA28-20S-PA28 Komplexen nachgewiesen werden (Cascio *et al.*, 2002). Ein Einfluss von PA28 auf die Degradation von Melan-A *in vivo* wurde durch Degradationsanalysen INF $\gamma$ -stimulierter Zellen ausgeschlossen (3.2.1). Dies steht in Übereinstimmung mit Untersuchungen, dass der Abbau von Proteinen durch PA28 nicht beeinflusst ist (Cascio *et al.*, 2002; Kloetzel, 2004; Sijts *et al.*, 2002).

In den *in vitro* Prozessierungsexperimenten zeigte sich, dass in Anwesenheit von PA28 die Hydrolyserate des Modellsubstrats durch SP und IP um ca. 50 % reduziert war (3.2.3.2). Für HIV-1 Tat, ein Protein des *human immunodeficiency virus-1* (Seeger *et al.*, 1997) und des endogenen Proteins Proteasominhibitor 31 (PI31) (Zaiss *et al.*, 1999; Zaiss *et al.*, 2002), dessen genau Funktion *in vivo* nicht bekannt ist, wurde gezeigt, dass sie zum einen die Aktivität des 20S Proteasoms inhibieren, und zum anderen mit PA28 um die Interaktion mit dem 20S Proteasom kompetieren. Eine Kompetition des Modellsubstrats Melan-A<sub>15-40</sub>, sowie ein inhibitorischer Effekt auf die Aktivität des 20S Proteasoms konnte hingegen durch Aktivitätsmessungen des Proteasoms in Gegenwart des Modellsubstrats und PA28 ausgeschlossen werden (3.2.3.2).

Vielmehr weist die vergleichbar verminderte Substrathydrolyserate beider Proteasomsubtypen in Anwesenheit von PA28 auf einen erschwerten Eintritt des Modellsubstrats in das 20S Proteasom über die Pore von PA28 hin. Der durch PA28 gebildete Kanal zum *gate* des 20S Proteasoms wird überwiegend aus polaren Aminosäuren gebildet (Rechsteiner *et al.*, 2000), die den Eintritt des Modellsubstrats, dessen Aminosäuren überwiegend hydrophob sind, inhibieren könnten (Abb. 39A). Demgegenüber war in Abwesenheit von PA28 die Substrathydrolyserate der 20S Proteasomen effizient und deutet auf einen unbeschränkten Eintritt des Modellsubstrats ins Proteasom hin. Dies steht in Übereinstimmung mit dem hydrophoben Charakters des *gates*, das damit bestens für den Eintritt des Modellsubstrats geeignet ist (Abb. 39B). Dies könnte die reduzierte Substrathydrolyserate von beiden Proteasomsubtypen in Gegenwart von PA28 und der effizienten Hydrolyse des Modellsubstrats in Abwesenheit des Regulators erklären.



**Abb. 39: Oberflächenmodelle des Innenraums von PA28 und des 20S Proteasoms.** (A) Ausschnitt der Zusammensetzung von geladenen Aminosäuren des Kanals eines PA28 $\alpha$  Heptamers. Eine Untereinheit ist in grün eingezeichnet. Basische Aminosäuren sind in blau und saure in rot dargestellt. (Li *et al.*, 2001) (B) Hydrophobizität der inneren und äußeren Oberfläche des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum*. Links ist der vertikale Schnitt des Proteasoms mit den Vorkammern (AC) und der katalytischen Kavität (CC) dargestellt, rechts die äußere Oberfläche eines  $\alpha$ -Rings. Die Skala zeigt die Farben, die für die Hydrophobizität in kcal/mol kodieren. (Baumeister *et al.*, 1998).

Darauf basierend wurde angenommen, dass die verminderte Substrathydrolyserate von SP/PA28 und IP/PA28 auf der Assoziation von SP und IP mit PA28 zurückzuführen ist und einem artifiziellen Zustand entspricht, der unter physiologischen Bedingungen nicht in Erscheinung tritt oder zumindest aufgrund des über 19S vermittelten Abbaus von Melan-A keine Relevanz *in vivo* besitzt. Es ist wahrscheinlich, dass die Generierung des Epitops *in vivo* aufgrund der über Polyubiquitin-abhängigen Degradation von Melan-A zumindest hauptsächlich über 26S Proteasomen bzw. über 26S-PA28 Proteasomen vermittelt wird. Es ist zwar theoretisch nicht auszuschließen, dass größere Fragmente von 26S Proteasomen bzw. 26S-PA28 Proteasomen freigesetzt werden, die durch 20S bzw. PA28-20S Proteasomen weiter prozessiert werden können. Allerdings beträgt die durchschnittliche Fragmentlänge von 20S Proteasomen 7-8 Aminosäuren (Dahlmann, 2005) und ist damit geringer als die des Epitops mit 10 Aminosäuren. Außerdem ist die durchschnittliche Fragmentlänge bei 26S Proteasomen sogar noch etwas weiter reduziert (Emmerich *et al.*, 2000; Kisselev *et al.*, 1999). Darüber hinaus weisen 26S und 26S-PA28 Proteasomen keine Unterschiede in den Fragmentlängen auf (Cascio *et al.*, 2002). Es scheint aus diesen Gründen sehr unwahrscheinlich, dass 26S Proteasomen oder 26S-PA28 Proteasomen Melan-A-Peptide mit der Sequenz des Modellsubstrats Melan-A<sub>15-40</sub> oder Varianten davon in ausreichenden Quantitäten generieren, die der Degradation durch Peptidasen im Cytosol entgehen und dann aufgrund des verminderten Eintritts in PA28-20S Proteasomen und modulierter Schnittpräferenzen zu einer veränderten Antigenpräsentation führen. Es ist demnach anzunehmen, dass ein inhibierter Eintritt eines Melan-A<sub>15-40</sub>-ähnlichen Melan-A-Peptides *in vivo* keine Relevanz besitzt. Deshalb wurden zur Analyse der Generierung des Epitops und der Schnittpräferenzen die Intensitäten der Prozessierungsfragmente, die in Anwesenheit von PA28

entstanden sind, normiert (3.2.3.2). Ungeachtet der Normierung war die Generierung des Epitops in Gegenwart von PA28 bei beiden Proteasomsubtypen deutlich vermindert.

Detaillierte Untersuchungen des Effektes von PA28 auf die Generierung von Epitopen zeigten, dass bereits etablierte, aber untergeordnete Schnittstellen mit höherer Präferenz genutzt werden. Dies führt zu einer effizienteren Prozessierung von Epitopen, die zwischen Schnittstellen liegen, die ohne PA28 mit niedrigerer Präferenz genutzt werden (Dick *et al.*, 1996; Kuckelkorn *et al.*, 2002; Stoltze *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu wird das Epitop Melan-A<sub>26-35</sub> in Anwesenheit von PA28 durch eine Reduktion von Schnitten zur Prozessierung des exakten N-Terminus des Epitops mit niedrigerer Effizienz generiert (3.2.3.2). Die Prozessierung des C-Terminus durch PA28 war hingegen nicht beeinflusst. Darüber hinaus wurde eine Schnittstelle innerhalb der Epitopsequenz in Gegenwart von PA28 mit höherer Präferenz genutzt, die sich bei IP/PA28 ebenfalls negativ auf die Epitopgenerierung auswirken könnte, da die Menge an Epitop-enthaltenden Fragmenten zur richtigen Prozessierung durch die Zerstörung der Epitopsequenz reduziert wird.

PA28 scheint neben der Öffnung des *gates* Konformationsänderungen des 20S Proteasoms zu induzieren, die zu Veränderungen der Substratbindungskanäle führen und dadurch die Affinität zum Substrat und dementsprechend die Schnittpräferenz modulieren (Harris *et al.*, 2001; Sijts *et al.*, 2002). Einen Hinweis auf mögliche allosterische Konformationsänderungen des 20S Proteasom durch PA28 bietet die Beobachtung, dass der Proteasominhibitor MG 132, der an die katalytischen Untereinheiten bindet, zu einer erhöhten Komplexbildung von freien 20S Proteasomen mit PA28 führt (Shibatani *et al.*, 2006). Dies weist darauf hin, dass die Bindung von MG 132 Konformationsänderungen induziert, die zu einer erhöhten Affinität der  $\alpha$ -Ringe des 20S Proteasoms zu PA28 führt. Diese funktionelle Verbindung zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten könnte ebenfalls durch die Bindung von PA28 eine Modulation der Substratbindungskanäle und folglich der Schnittpräferenz auslösen. Gestützt wird diese Annahme auch von der Untersuchung der PA28-Abhängigkeit des Epitops TRP2<sub>360-368</sub>, dessen N-terminal flankierende Sequenz den Einfluss von PA28 auf die Generierung des Epitops determiniert. Erst in Gegenwart von PA28 wird das Epitops und *Precursor*-Epitope generiert (Textoris-Taube *et al.*, 2007). Durch den reziproken Austausch der N-terminal flankierenden Sequenz des Epitops TRP2<sub>360-368</sub> mit der N-terminal flankierenden Sequenz eines PA28-unabhängigen Epitops des Cytomegalovirus wurde die PA28-abhängige Generierung auf das Epitop des Cytomegalovirus übertragen und die PA28-unabhängige Generierung auf TRP2<sub>360-368</sub>. Die N-terminal flankierende Sequenz des Epitops war demnach für den Einfluss von PA28 auf die Generierung verantwortlich. Dies weist auf eine

Modulation der Substratbindungskanäle durch PA28 hin, die eine höhere Affinität der N-terminal flankierenden Sequenz des Epitops zu den Substratbindungstaschen der Kanäle induziert. Dadurch würde die Wahrscheinlichkeit einer Proteolyse in der N-terminalen Sequenz des Substrats, zur Generierung des Epitops oder von *Precursor*-Epitopen drastisch erhöht. *Vice versa* könnte bei der Generierung von Melan-A<sub>26-35</sub> die N-terminal flankierende Sequenz des Epitops eine niedrigere Affinität zu den durch PA28 modulierten Substratbindungstaschen bewirken und damit die Reduktion der Präferenz von Schnitten nach Glu<sup>25</sup> zur Generierung des exakten N-Terminus induzieren bzw. die Präferenz des Schnittes innerhalb der Epitopsequenz steigern. Während ein erschwerter Eintritt von Melan-A-Peptiden *in vivo* wahrscheinlich keine Relevanz besitzt, wurde demonstriert, dass PA28, aufgrund einer ineffizienten Prozessierung des N-Terminus des Epitops Melan-A<sub>26-35</sub>, die Antigenpräsentation und in Folge dessen die CTL-Erkennung negativ beeinflusst. Die Generierung des Epitops wird in Folge dessen nicht nur durch Immununtereinheiten, sondern gleichfalls durch PA28 moduliert, und ist wahrscheinlich ebenso auf Konformationsänderungen des Proteasoms zurückzuführen.

#### 4.2.4 Einfluss von Proteasomsubtypen auf die Eliminierung von Melanomzellen

HeLa-Zellen weisen nach INF $\gamma$ -Exposition IMP als dominante Proteasomenpopulation auf (Klare *et al.*, 2007). Hingegen gibt es Hinweise, dass Melanomzellen und ebenfalls Melanozyten schon *per se* IMP exprimieren. Sowohl die Klone 6, 18 und 30, als auch die parentale Zelllinie Mel 15 zeigen bereits konstitutiv heterogene Muster der Expression von Immununtereinheiten (3.3.2.5) und reflektieren damit die Situation *in vivo*. Eine heterogene Expression von Immununtereinheiten wurde ebenfalls innerhalb verschiedener Melanome und einzelner Läsionen *in vivo* dokumentiert (Marincola *et al.*, 2000). Während in Melanozyten bereits die Immununtereinheit  $\beta 5i$  exprimiert wird (Seliger *et al.*, 2000), weisen Melanomzellen zusätzlich zum großen Teil eine konstitutive Expression von  $\beta 1i$  und/oder  $\beta 2i$  auf (Marincola *et al.*, 2000).

Demnach stellt bereits die konstitutive Expression von  $\beta 1i$  und/oder  $\beta 2i$ , die in der überwiegenden Mehrheit von Zellen des Melanoms auftreten, ein Immunevasionsmechanismus gegenüber Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischen CTL dar. Die Effizienz dieses Resistenzmechanismus wird dabei durch die INF $\gamma$ -Exposition der Zellen durch CTL-Erkennung und Cytokinausschüttung während der Tumorprogression oder der Lokalisation von Melanomzellen in lymphatischen Geweben deutlich verstärkt, indem die Expression von Immununtereinheiten zunimmt (3.3.2.5). Dies zeigt die verminderte Antigenpräsentation von Mel 15-Zellen nach INF $\gamma$ -

Exposition (3.3.2.6) und die Beobachtungen von Morel *et al* nach INF $\gamma$ -Stimulation von Melanomzellen (Morel *et al.*, 2000). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der Antigenpräsentation durch die INF $\gamma$ -induzierte Expression von PA28 noch verstärkt wird (3.2.3.1). Neben Melan-A<sub>26-35</sub> ist ebenfalls die Antigenpräsentation von Epitopen der Differenzierungsantigene wie gp100<sub>209-217</sub> und Tyrosinase<sub>369-377</sub> durch IP negativ beeinflusst (Chapiro *et al.*, 2006; Morel *et al.*, 2000). Die Expression von Immununtereinheiten kann dadurch die Evasion von Tumorzellen gegenüber der CTL-Erkennung von Differenzierungsantigenen ermöglichen, insbesondere in einem INF $\gamma$ -reichen Milieu, wie in lymphatischen Organen oder in Tumoren, die mit CTL infiltriert sind. Dies könnte eine Erklärung für die Beobachtung der Koexistenz von Tumorzellen und aktiven CTL in Lymphknoten von Melanompatienten sein (Romero *et al.*, 1998). Dieser Resistenzmechanismus könnte ebenfalls durch die systemische INF $\gamma$ -Behandlung von Melanompatienten gefördert werden, da Studien in einigen Fällen eine erhöhte Tumorprogression nach INF $\gamma$ -Behandlung zeigten (Kowalick *et al.*, 1990; Meyskens *et al.*, 1990).

Die ineffiziente Generierung von Melan-A<sub>26-35</sub> durch IP, IMP und PA28 (3.2.2.2, 3.2.3.2) hat nicht nur einen Einfluss auf die CTL-Erkennung von Melanomzellen, sondern ebenfalls auf die Aktivierung Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischer CTL. Dendritische Zellen sind für die Aktivierung von naiven CTL verantwortlich, indem sie internalisierte Proteine prozessieren und präsentieren (Adams *et al.*, 2005). Allerdings exprimieren sie konstitutiv IP und PA28 (Macagno *et al.*, 1999), was zu einer ineffizienten Präsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> und somit zu einer unzureichenden Aktivierung der CTL führt (Chapatte *et al.*, 2006). Neben dem hier beschriebenen Resistenzmechanismus, der Melanomzellen der Erkennung durch Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifische CTL entzieht, könnte ebenfalls die ineffiziente Induktion der CTL-Antwort aufgrund der unzureichenden Aktivierung der CTL einen wesentlichen Einfluss auf die Progression des Melanoms ausüben. Selbst nach Vakkzinierungen von Melanompatienten mit Melan-A<sub>26-35</sub>-Peptiden liegt der Anteil an Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischen CTL bei nur 0,1-2,2 % an der Gesamtpopulation von CTL (Coulie und van der Bruggen, 2003). Im Gegensatz dazu liegt bei viralen Infektionen wie beim Epstein-Barr-Virus (EBV), die eliminiert oder zumindest vom Immunsystem kontrolliert werden können, der Anteil der CTL für ein spezifisches EBV-Epitop bei bis zu 44 % an der Gesamtpopulation (Callan *et al.*, 1998). In diesem Kontext, und unter Berücksichtigung der Etablierung von Resistenzmechanismen, ist es nicht verwunderlich, dass Melanompatienten nach Immuntherapien lediglich in 5-20 % der Fälle Tumorregressionen aufweisen (Coulie und van der Bruggen, 2003).

Eine ineffiziente Generierung und Präsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> wird neben Immununtereinheiten ebenfalls durch PA28 induziert. Die ineffiziente Präsentation des Epitops durch die verschiedenen Proteasomsubtypen limitiert damit erheblich die Wahrscheinlichkeit von Tumorzellen während der Tumorprogression in Folge der INF $\gamma$ -Exposition von Melan-A<sub>26-35</sub>-spezifischen CTL erkannt und eliminiert zu werden. Insbesondere durch die Immundominanz des Epitops Melan-A<sub>26-35</sub> kann dies bezüglich der ineffizienten Aktivierung von CTL durch dendritische Zellen und der unzureichenden Erkennung von Tumorzellen zur Immunevasion von Melanomzellen *in vivo* führen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Effizienz der Antigenpräsentation von Melan-A<sub>26-35</sub> nicht nur durch die Art des Proteasomsubtyps beeinflusst wird, sondern ebenfalls von der funktionellen Integrität des ERAD-Systems. Modulationen des UPS in Folge des *cancer immunoediting* können dadurch nicht nur die Progression von Tumoren fördern, sondern ebenfalls die Effektivität von Immuntherapien obstruieren. Angesichts der Evolution von Resistenzmechanismen ist es von hoher klinischer Relevanz, den Entwicklungsverlauf von Tumoren zu analysieren und Immuntherapien den etablierten Immunevasionsmechanismen fortlaufend anzupassen.

## LITERATUR

- Adams, S.; O'Neill, D. W. und Bhardwaj, N. (2005): Recent advances in dendritic cell biology, *J Clin Immunol* 25 [3], Seite 177-88.
- Ahn, J. Y.; Tanahashi, N.; Akiyama, K.; Hisamatsu, H.; Noda, C.; Tanaka, K.; Chung, C. H.; Shibmara, N.; Willy, P. J.; Mott, J. D. und et al. (1995): Primary structures of two homologous subunits of PA28, a gamma-interferon-inducible protein activator of the 20S proteasome, *FEBS Lett* 366 [1], Seite 37-42.
- Altomare, D. A. und Testa, J. R. (2005): Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer, *Oncogene* 24 [50], Seite 7455-64.
- Amiot, L.; Onno, M.; Lamy, T.; Dauriac, C.; Le Prise, P. Y.; Fauchet, R. und Drenou, B. (1998): Loss of HLA molecules in B lymphomas is associated with an aggressive clinical course, *Br J Haematol* 100 [4], Seite 655-63.
- Aptsiauri, N.; Cabrera, T.; Garcia-Lora, A.; Lopez-Nevot, M. A.; Ruiz-Cabello, F. und Garrido, F. (2007): MHC class I antigens and immune surveillance in transformed cells, *Int Rev Cytol* 256, Seite 139-89.
- Arendt, C. S. und Hochstrasser, M. (1999): Eukaryotic 20S proteasome catalytic subunit propeptides prevent active site inactivation by N-terminal acetylation and promote particle assembly, *EMBO J* 18 [13], Seite 3575-85.
- Babbitt, S. E.; Kiss, A.; Deffenbaugh, A. E.; Chang, Y. H.; Bailly, E.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Buranda, T.; Sklar, L. A.; Bauml, J.; Gogol, E. und Skowry, D. (2005): ATP hydrolysis-dependent disassembly of the 26S proteasome is part of the catalytic cycle, *Cell* 121 [4], Seite 553-65.
- Bakker, A. B.; Schreurs, M. W.; de Boer, A. J.; Kawakami, Y.; Rosenberg, S. A.; Adema, G. J. und Figdor, C. G. (1994): Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes, *J Exp Med* 179 [3], Seite 1005-9.
- Basler, M.; Youhnovski, N.; Van Den Broek, M.; Przybylski, M. und Groettrup, M. (2004): Immunoproteasomes down-regulate presentation of a subdominant T cell epitope from lymphocytic choriomeningitis virus, *J Immunol* 173 [6], Seite 3925-34.
- Baumeister, W.; Walz, J.; Zuhl, F. und Seemuller, E. (1998): The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease, *Cell* 92 [3], Seite 367-80.
- Baylin, S. B. und Ohm, J. E. (2006): Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction?, *Nat Rev Cancer* 6 [2], Seite 107-16.
- Berset, M.; Cerottini, J. P.; Guggisberg, D.; Romero, P.; Burri, F.; Rimoldi, D. und Panizzon, R. G. (2001): Expression of Melan-A/MART-1 antigen as a prognostic factor in primary cutaneous melanoma, *Int J Cancer* 95 [1], Seite 73-7.
- Bettinotti, M. P.; Kim, C. J.; Lee, K. H.; Roden, M.; Cormier, J. N.; Panelli, M.; Parker, K. K. und Marincola, F. M. (1998): Stringent allele/epitope requirements for MART-1/Melan A immunodominance: implications for peptide-based immunotherapy, *J Immunol* 161 [2], Seite 877-89.
- Boes, B.; Hengel, H.; Ruppert, T.; Multhaupt, G.; Koszinowski, U. H. und Kloetzel, P. M. (1994): Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes, *J Exp Med* 179 [3], Seite 901-9.
- Bontkes, H. J.; Walboomers, J. M.; Meijer, C. J.; Helmerhorst, T. J. und Stern, P. L. (1998): Specific HLA class I down-regulation is an early event in cervical dysplasia associated with clinical progression, *Lancet* 351 [9097], Seite 187-8.
- Boon, T.; Coulie, P. G.; Van den Eynde, B. J. und van der Bruggen, P. (2006): Human T cell responses against melanoma, *Annu Rev Immunol* 24, Seite 175-208.
- Borissenko, L. und Groll, M. (2007): Diversity of proteasomal missions: fine tuning of the immune response, *Biol Chem* 388 [9], Seite 947-55.
- Bose, S.; Stratford, F. L.; Broadfoot, K. I.; Mason, G. G. und Rivett, A. J. (2004): Phosphorylation of 20S proteasome alpha subunit C8 (alpha7) stabilizes the 26S proteasome and plays a role in the regulation of proteasome complexes by gamma-interferon, *Biochem J* 378 [Pt 1], Seite 177-84.
- Bots, M.; Kolfsooten, I. G.; Bres, S. A.; Rademaker, M. T.; de Roo, G. M.; Kruse, M.; Franken, K. L.; Hahne, M.; Froelich, C. J.; Melief, C. J.; Offringa, R. und Medema, J. P. (2005): SPI-CI and SPI-6 cooperate in the protection from effector cell-mediated cytotoxicity, *Blood* 105 [3], Seite 1153-61.
- Brichard, V.; Van Pel, A.; Wolfel, T.; Wolfel, C.; De Plaen, E.; Lethe, B.; Coulie, P. und Boon, T. (1993): The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas, *J Exp Med* 178 [2], Seite 489-95.



- Bullani, R. R.; Wehrli, P.; Viard-Leveugle, I.; Rimoldi, D.; Cerottini, J. C.; Saurat, J. H.; Tschopp, J. und French, L. E. (2002): Frequent downregulation of Fas (CD95) expression and function in melanoma, *Melanoma Res* 12 [3], Seite 263-70.
- Cabrera, T.; Angustias Fernandez, M.; Sierra, A.; Garrido, A.; Herruzo, A.; Escobedo, A.; Fabra, A. und Garrido, F. (1996): High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive breast carcinomas, *Hum Immunol* 50 [2], Seite 127-34.
- Callan, M. F.; Tan, L.; Annels, N.; Ogg, G. S.; Wilson, J. D.; O'Callaghan, C. A.; Steven, N.; McMichael, A. J. und Rickinson, A. B. (1998): Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus In vivo, *J Exp Med* 187 [9], Seite 1395-402.
- Cardozo, C. und Kohanski, R. A. (1998): Altered properties of the branched chain amino acid-preferring activity contribute to increased cleavages after branched chain residues by the "immunoproteasome", *J Biol Chem* 273 [27], Seite 16764-70.
- Cascio, P.; Call, M.; Petre, B. M.; Walz, T. und Goldberg, A. L. (2002): Properties of the hybrid form of the 26S proteasome containing both 19S and PA28 complexes, *EMBO J* 21 [11], Seite 2636-45.
- Cascio, P.; Hilton, C.; Kisselev, A. F.; Rock, K. L. und Goldberg, A. L. (2001): 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide, *EMBO J* 20 [10], Seite 2357-66.
- Castriconi, R.; Cantoni, C.; Della Chiesa, M.; Vitale, M.; Marcenaro, E.; Conte, R.; Biassoni, R.; Bottino, C.; Moretta, L. und Moretta, A. (2003): Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 [7], Seite 4120-5.
- Chapatte, L.; Ayyoub, M.; Morel, S.; Peitrequin, A. L.; Levy, N.; Servis, C.; Van den Eynde, B. J.; Valmori, D. und Levy, F. (2006): Processing of tumor-associated antigen by the proteasomes of dendritic cells controls in vivo T-cell responses, *Cancer Res* 66 [10], Seite 5461-8.
- Chapatte, L.; Servis, C.; Valmori, D.; Burlet-Schiltz, O.; Dayer, J.; Monsarrat, B.; Romero, P. und Levy, F. (2004): Final antigenic Melan-A peptides produced directly by the proteasomes are preferentially selected for presentation by HLA-A\*0201 in melanoma cells, *J Immunol* 173 [10], Seite 6033-40.
- Chapiro, J.; Claverol, S.; Piette, F.; Ma, W.; Stroobant, V.; Guillaume, B.; Gairin, J. E.; Morel, S.; Burlet-Schiltz, O.; Monsarrat, B.; Boon, T. und Van den Eynde, B. J. (2006): Destructive cleavage of antigenic peptides either by the immunoproteasome or by the standard proteasome results in differential antigen presentation, *J Immunol* 176 [2], Seite 1053-61.
- Chen, P. und Hochstrasser, M. (1996): Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly, *Cell* 86 [6], Seite 961-72.
- Chen, W.; Pang, K.; Masterman, K. A.; Kennedy, G.; Basta, S.; Dimopoulos, N.; Hornung, F.; Smyth, M.; Bennink, J. R. und Yewdell, J. W. (2004): Reversal in the immunodominance hierarchy in secondary CD8+ T cell responses to influenza A virus: roles for cross-presentation and lysis-independent immunodomination, *J Immunol* 173 [8], Seite 5021-7.
- Ciechanover, A. (2005): Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting, *Cell Death Differ* 12 [9], Seite 1178-90.
- Cormier, J. N.; Panelli, M. C.; Hackett, J. A.; Bettinotti, M. P.; Mixon, A.; Wunderlich, J.; Parker, L. L.; Restifo, N. P.; Ferrone, S. und Marincola, F. M. (1999): Natural variation of the expression of HLA and endogenous antigen modulates CTL recognition in an in vitro melanoma model, *Int J Cancer* 80 [5], Seite 781-90.
- Coulie, P. G. und van der Bruggen, P. (2003): T-cell responses of vaccinated cancer patients, *Curr Opin Immunol* 15 [2], Seite 131-7.
- Coux, O.; Tanaka, K. und Goldberg, A. L. (1996): Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes, *Annu Rev Biochem* 65, Seite 801-47.
- da Fonseca, P. C. und Morris, E. P. (2008): Structure of the human 26S proteasome: subunit radial displacements open the gate into the proteolytic core, *J Biol Chem* 283 [34], Seite 23305-14.
- Dahlmann, B. (2005): Proteasomes, *Essays Biochem* 41, Seite 31-48.
- Dahlmann, B.; Ruppert, T.; Kloetzel, P. M. und Kuehn, L. (2001): Subtypes of 20S proteasomes from skeletal muscle, *Biochimie* 83 [3-4], Seite 295-9.
- Dahlmann, B.; Ruppert, T.; Kuehn, L.; Merforth, S. und Kloetzel, P. M. (2000): Different proteasome subtypes in a single tissue exhibit different enzymatic properties, *J Mol Biol* 303 [5], Seite 643-53.
- De, M.; Jayarapu, K.; Elenich, L.; Monaco, J. J.; Colbert, R. A. und Griffin, T. A. (2003): Beta 2 subunit propeptides influence cooperative proteasome assembly, *J Biol Chem* 278 [8], Seite 6153-9.

- De Maziere, A. M.; Muehlethaler, K.; van Donselaar, E.; Salvi, S.; Davoust, J.; Cerottini, J. C.; Levy, F.; Slot, J. W. und Rimoldi, D. (2002): The melanocytic protein Melan-A/MART-1 has a subcellular localization distinct from typical melanosomal proteins, *Traffic* 3 [9], Seite 678-93.
- Dick, T. P.; Ruppert, T.; Groettrup, M.; Kloetzel, P. M.; Kuehn, L.; Koszinowski, U. H.; Stevanovic, S.; Schild, H. und Rammensee, H. G. (1996): Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands, *Cell* 86 [2], Seite 253-62.
- Dissemond, J. und Grabbe, S. (2006): [Role of MHC class I molecules in anti-tumoral mechanisms in human malignant melanoma], *Hautarzt* 57 [8], Seite 690-6.
- Dubiel, W.; Pratt, G.; Ferrell, K. und Rechsteiner, M. (1992): Purification of an 11 S regulator of the multicatalytic protease, *J Biol Chem* 267 [31], Seite 22369-77.
- Dudley, M. E.; Wunderlich, J. R.; Robbins, P. F.; Yang, J. C.; Hwu, P.; Schwartzentruber, D. J.; Topalian, S. L.; Sherry, R.; Restifo, N. P.; Hubicki, A. M.; Robinson, M. R.; Raffeld, M.; Duray, P.; Seipp, C. A.; Rogers-Freezer, L.; Morton, K. E.; Mavroukakis, S. A.; White, D. E. und Rosenberg, S. A. (2002): Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes, *Science* 298 [5594], Seite 850-4.
- Dunn, G. P.; Old, L. J. und Schreiber, R. D. (2004): The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting, *Immunity* 21 [2], Seite 137-48.
- Durda, P. J.; Dunn, I. S.; Rose, L. B.; Butera, D.; Benson, E. M.; Pandolfi, F. und Kurnick, J. T. (2003): Induction of "antigen silencing" in melanomas by oncostatin M: down-modulation of melanocyte antigen expression, *Mol Cancer Res* 1 [6], Seite 411-9.
- Ebstein, F.; Lange, N.; Urban, S.; Seifert, U.; Kruger, E. und Kloetzel, P. M. (2008): Maturation of human dendritic cells is accompanied by functional remodelling of the ubiquitin-proteasome system, *Int J Biochem Cell Biol*.
- Emmerich, N. P.; Nussbaum, A. K.; Stevanovic, S.; Priemer, M.; Toes, R. E.; Rammensee, H. G. und Schild, H. (2000): The human 26 S and 20 S proteasomes generate overlapping but different sets of peptide fragments from a model protein substrate, *J Biol Chem* 275 [28], Seite 21140-8.
- Fang, S.; Ferrone, M.; Yang, C.; Jensen, J. P.; Tiwari, S. und Weissman, A. M. (2001): The tumor autocrine motility factor receptor, gp78, is a ubiquitin protein ligase implicated in degradation from the endoplasmic reticulum, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 [25], Seite 14422-7.
- Ferris, R. L.; Hall, C.; Sipsas, N. V.; Safrit, J. T.; Trocha, A.; Koup, R. A.; Johnson, R. P. und Siliciano, R. F. (1999): Processing of HIV-1 envelope glycoprotein for class I-restricted recognition: dependence on TAP1/2 and mechanisms for cytosolic localization, *J Immunol* 162 [3], Seite 1324-32.
- Fonteneau, J. F.; Larsson, M.; Somersan, S.; Sanders, C.; Munz, C.; Kwok, W. W.; Bhardwaj, N. und Jotereau, F. (2001): Generation of high quantities of viral and tumor-specific human CD4+ and CD8+ T-cell clones using peptide pulsed mature dendritic cells, *J Immunol Methods* 258 [1-2], Seite 111-26.
- Fremont, D. H.; Matsumura, M.; Stura, E. A.; Peterson, P. A. und Wilson, I. A. (1992): Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2Kb, *Science* 257 [5072], Seite 919-27.
- Frentzel, S.; Pesold-Hurt, B.; Seelig, A. und Kloetzel, P. M. (1994): 20 S proteasomes are assembled via distinct precursor complexes. Processing of LMP2 and LMP7 proproteins takes place in 13-16 S preproteasome complexes, *J Mol Biol* 236 [4], Seite 975-81.
- Garbi, N.; Tanaka, S.; Momburg, F. und Hammerling, G. J. (2006): Impaired assembly of the major histocompatibility complex class I peptide-loading complex in mice deficient in the oxidoreductase ERp57, *Nat Immunol* 7 [1], Seite 93-102.
- Garcia-Lora, A.; Martinez, M.; Algarra, I.; Gaforio, J. J. und Garrido, F. (2003): MHC class I-deficient metastatic tumor variants immunoselected by T lymphocytes originate from the coordinated downregulation of APM components, *Int J Cancer* 106 [4], Seite 521-7.
- Garrido, F. und Algarra, I. (2001): MHC antigens and tumor escape from immune surveillance, *Adv Cancer Res* 83, Seite 117-58.
- Garrido, F.; Ruiz-Cabello, F.; Cabrera, T.; Perez-Villar, J. J.; Lopez-Botet, M.; Duggan-Keen, M. und Stern, P. L. (1997): Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours, *Immunol Today* 18 [2], Seite 89-95.
- Glickman, M. H. und Ciechanover, A. (2002): The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction, *Physiol Rev* 82 [2], Seite 373-428.
- Glickman, M. H.; Rubin, D. M.; Coux, O.; Wefes, I.; Pfeifer, G.; Cjeka, Z.; Baumeister, W.; Fried, V. A. und Finley, D. (1998): A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3, *Cell* 94 [5], Seite 615-23.

- Goldberg, A. L. und Dice, J. F. (1974): Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells, *Annu Rev Biochem* 43 [0], Seite 835-69.
- Griffin, T. A.; Nandi, D.; Cruz, M.; Fehling, H. J.; Kaer, L. V.; Monaco, J. J. und Colbert, R. A. (1998): Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits, *J Exp Med* 187 [1], Seite 97-104.
- Groettrup, M.; Standera, S.; Stohwasser, R. und Kloetzel, P. M. (1997): The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 [17], Seite 8970-5.
- Groll, M.; Bajorek, M.; Kohler, A.; Moroder, L.; Rubin, D. M.; Huber, R.; Glickman, M. H. und Finley, D. (2000): A gated channel into the proteasome core particle, *Nat Struct Biol* 7 [11], Seite 1062-7.
- Groll, M.; Bochtler, M.; Brandstetter, H.; Clausen, T. und Huber, R. (2005): Molecular machines for protein degradation, *Chembiochem* 6 [2], Seite 222-56.
- Groll, M.; Ditzel, L.; Lowe, J.; Stock, D.; Bochtler, M.; Bartunik, H. D. und Huber, R. (1997): Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution, *Nature* 386 [6624], Seite 463-71.
- Groll, M.; Heinemeyer, W.; Jager, S.; Ullrich, T.; Bochtler, M.; Wolf, D. H. und Huber, R. (1999): The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 [20], Seite 10976-83.
- Groll, M. und Huber, R. (2003): Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle, *Int J Biochem Cell Biol* 35 [5], Seite 606-16.
- Halaban, R.; Cheng, E.; Zhang, Y.; Moellmann, G.; Hanlon, D.; Michalak, M.; Setaluri, V. und Hebert, D. N. (1997): Aberrant retention of tyrosinase in the endoplasmic reticulum mediates accelerated degradation of the enzyme and contributes to the dedifferentiated phenotype of amelanotic melanoma cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 [12], Seite 6210-5.
- Harris, J. L.; Alper, P. B.; Li, J.; Rechsteiner, M. und Backes, B. J. (2001): Substrate specificity of the human proteasome, *Chem Biol* 8 [12], Seite 1131-41.
- Held, G.; Neumann, F.; Sturm, C.; Kaestner, L.; Dauth, N.; de Bruijn, D. R.; Renner, C.; Lipp, P. und Pfreundschuh, M. (2008): Differential presentation of tumor antigen-derived epitopes by MHC-class I and antigen-positive tumor cells, *Int J Cancer* 123 [8], Seite 1841-7.
- Hoashi, T.; Watabe, H.; Muller, J.; Yamaguchi, Y.; Vieira, W. D. und Hearing, V. J. (2005): MART-1 is required for the function of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 and the maturation of melanosomes, *J Biol Chem* 280 [14], Seite 14006-16.
- Holzthutter, H. G.; Frommel, C. und Kloetzel, P. M. (1999): A theoretical approach towards the identification of cleavage-determining amino acid motifs of the 20 S proteasome, *J Mol Biol* 286 [4], Seite 1251-65.
- Ivanov, V. N.; Bhoumik, A. und Ronai, Z. (2003): Death receptors and melanoma resistance to apoptosis, *Oncogene* 22 [20], Seite 3152-61.
- Jager, S.; Groll, M.; Huber, R.; Wolf, D. H. und Heinemeyer, W. (1999): Proteasome beta-type subunits: unequal roles of propeptides in core particle maturation and a hierarchy of active site function, *J Mol Biol* 291 [4], Seite 997-1013.
- Kawakami, Y.; Eliyahu, S.; Delgado, C. H.; Robbins, P. F.; Rivoltini, L.; Topalian, S. L.; Miki, T. und Rosenberg, S. A. (1994): Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 [9], Seite 3515-9.
- Khong, H. T. und Restifo, N. P. (2002): Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes, *Nat Immunol* 3 [11], Seite 999-1005.
- Kikkert, M.; Doolman, R.; Dai, M.; Avner, R.; Hassink, G.; van Voorden, S.; Thanedar, S.; Roitelman, J.; Chau, V. und Wiertz, E. (2004): Human HRD1 is an E3 ubiquitin ligase involved in degradation of proteins from the endoplasmic reticulum, *J Biol Chem* 279 [5], Seite 3525-34.
- Kingsbury, D. J.; Griffin, T. A. und Colbert, R. A. (2000): Novel propeptide function in 20 S proteasome assembly influences beta subunit composition, *J Biol Chem* 275 [31], Seite 24156-62.
- Kisselev, A. F.; Akopian, T. N.; Castillo, V. und Goldberg, A. L. (1999): Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown, *Mol Cell* 4 [3], Seite 395-402.
- Kisselev, A. F.; Akopian, T. N.; Woo, K. M. und Goldberg, A. L. (1999): The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation, *J Biol Chem* 274 [6], Seite 3363-71.
- Kisselev, A. F.; Garcia-Calvo, M.; Overkleeft, H. S.; Peterson, E.; Pennington, M. W.; Ploegh, H. L.; Thornberry, N. A. und Goldberg, A. L. (2003): The caspase-like sites of proteasomes, their substrate specificity, new

- inhibitors and substrates, and allosteric interactions with the trypsin-like sites, *J Biol Chem* 278 [38], Seite 35869-77.
- Kisselev, A. F.; Kaganovich, D. und Goldberg, A. L. (2002): Binding of hydrophobic peptides to several non-catalytic sites promotes peptide hydrolysis by all active sites of 20 S proteasomes. Evidence for peptide-induced channel opening in the alpha-rings, *J Biol Chem* 277 [25], Seite 22260-70.
- Klare, N.; Seeger, M.; Janek, K.; Jungblut, P. R. und Dahlmann, B. (2007): Intermediate-type 20 S proteasomes in HeLa cells: "asymmetric" subunit composition, diversity and adaptation, *J Mol Biol* 373 [1], Seite 1-10.
- Klein, J. B.; Barati, M. T.; Wu, R.; Gozal, D.; Sachleben, L. R., Jr.; Kausar, H.; Trent, J. O.; Gozal, E. und Rane, M. J. (2005): Akt-mediated valosin-containing protein 97 phosphorylation regulates its association with ubiquitinated proteins, *J Biol Chem* 280 [36], Seite 31870-81.
- Kloetzel, P. M. (2001): Antigen processing by the proteasome, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 [3], Seite 179-87.
- Kloetzel, P. M. (2004): Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII, *Nat Immunol* 5 [7], Seite 661-9.
- Kloetzel, P. M. (2004): The proteasome and MHC class I antigen processing, *Biochim Biophys Acta* 1695 [1-3], Seite 225-33.
- Knowlton, J. R.; Johnston, S. C.; Whitby, F. G.; Realini, C.; Zhang, Z.; Rechsteiner, M. und Hill, C. P. (1997): Structure of the proteasome activator REGalpha (PA28alpha), *Nature* 390 [6660], Seite 639-43.
- Kohler, A.; Bajorek, M.; Groll, M.; Moroder, L.; Rubin, D. M.; Huber, R.; Glickman, M. H. und Finley, D. (2001): The substrate translocation channel of the proteasome, *Biochimie* 83 [3-4], Seite 325-32.
- Kopp, F.; Dahlmann, B. und Kuehn, L. (2001): Reconstitution of hybrid proteasomes from purified PA700-20 S complexes and PA28alphabeta activator: ultrastructure and peptidase activities, *J Mol Biol* 313 [3], Seite 465-71.
- Kowalick, L.; Weyer, U.; Lange, P. und Breitbart, E. W. (1990): Systemic therapy of advanced metastatic malignant melanoma with a combination of fibroblast interferon-beta and recombinant interferon-gamma, *Dermatologica* 181 [4], Seite 298-303.
- Kruger, E.; Kuckelkorn, U.; Sijts, A. und Kloetzel, P. M. (2003): The components of the proteasome system and their role in MHC class I antigen processing, *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 148, Seite 81-104.
- Kuckelkorn, U.; Ferreira, E. A.; Drung, I.; Liewer, U.; Kloetzel, P. M. und Theobald, M. (2002): The effect of the interferon-gamma-inducible processing machinery on the generation of a naturally tumor-associated human cytotoxic T lymphocyte epitope within a wild-type and mutant p53 sequence context, *Eur J Immunol* 32 [5], Seite 1368-75.
- Kuckelkorn, U.; Frenz, S.; Kraft, R.; Kostka, S.; Groettrup, M. und Kloetzel, P. M. (1995): Incorporation of major histocompatibility complex-encoded subunits LMP2 and LMP7 changes the quality of the 20S proteasome polypeptide processing products independent of interferon-gamma, *Eur J Immunol* 25 [9], Seite 2605-11.
- Kuehn, L. und Dahlmann, B. (1996): Proteasome activator PA28 and its interaction with 20 S proteasomes, *Arch Biochem Biophys* 329 [1], Seite 87-96.
- Kurnick, J. T.; Ramirez-Montagut, T.; Boyle, L. A.; Andrews, D. M.; Pandolfi, F.; Durda, P. J.; Butera, D.; Dunn, I. S.; Benson, E. M.; Gobin, S. J. und van den Elsen, P. J. (2001): A novel autocrine pathway of tumor escape from immune recognition: melanoma cell lines produce a soluble protein that diminishes expression of the gene encoding the melanocyte lineage melan-A/MART-1 antigen through down-modulation of its promoter, *J Immunol* 167 [3], Seite 1204-11.
- Kwon, Y. D.; Nagy, I.; Adams, P. D.; Baumeister, W. und Jap, B. K. (2004): Crystal structures of the Rhodococcus proteasome with and without its pro-peptides: implications for the role of the pro-peptide in proteasome assembly, *J Mol Biol* 335 [1], Seite 233-45.
- Le Poole, I. C.; Gerberi, M. A. und Kast, W. M. (2002): Emerging strategies in tumor vaccines, *Curr Opin Oncol* 14 [6], Seite 641-8.
- Levy, F.; Muehlethaler, K.; Salvi, S.; Peitrequin, A. L.; Lindholm, C. K.; Cerottini, J. C. und Rimoldi, D. (2005): Ubiquitylation of a melanosomal protein by HECT-E3 ligases serves as sorting signal for lysosomal degradation, *Mol Biol Cell* 16 [4], Seite 1777-87.
- Li, J.; Gao, X.; Ortega, J.; Nazif, T.; Joss, L.; Bogyo, M.; Steven, A. C. und Rechsteiner, M. (2001): Lysine 188 substitutions convert the pattern of proteasome activation by REGgamma to that of REGs alpha and beta, *EMBO J* 20 [13], Seite 3359-69.
- Lilley, B. N. und Ploegh, H. L. (2004): A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER, *Nature* 429 [6994], Seite 834-40.

- Liu, C. W.; Li, X.; Thompson, D.; Wooding, K.; Chang, T. L.; Tang, Z.; Yu, H.; Thomas, P. J. und DeMartino, G. N. (2006): ATP binding and ATP hydrolysis play distinct roles in the function of 26S proteasome, *Mol Cell* 24 [1], Seite 39-50.
- Loureiro, J. und Ploegh, H. L. (2006): Antigen presentation and the ubiquitin-proteasome system in host-pathogen interactions, *Adv Immunol* 92, Seite 225-305.
- Lowe, J.; Stock, D.; Jap, B.; Zwickl, P.; Baumeister, W. und Huber, R. (1995): Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution, *Science* 268 [5210], Seite 533-9.
- Lozupone, F.; Rivoltini, L.; Luciani, F.; Venditti, M.; Lugini, L.; Cova, A.; Squarcina, P.; Parmiani, G.; Belardelli, F. und Fais, S. (2003): Adoptive transfer of an anti-MART-1(27-35)-specific CD8<sup>+</sup> T cell clone leads to immunoselection of human melanoma antigen-loss variants in SCID mice, *Eur J Immunol* 33 [2], Seite 556-66.
- Luciani, F.; Kesmir, C.; Mishto, M.; Or-Guil, M. und de Boer, R. J. (2005): A mathematical model of protein degradation by the proteasome, *Biophys J* 88 [4], Seite 2422-32.
- Ma, C. P.; Slaughter, C. A. und DeMartino, G. N. (1992): Identification, purification, and characterization of a protein activator (PA28) of the 20 S proteasome (macropain), *J Biol Chem* 267 [15], Seite 10515-23.
- Macagno, A.; Gilliet, M.; Sallusto, F.; Lanzavecchia, A.; Nestle, F. O. und Groettrup, M. (1999): Dendritic cells up-regulate immunoproteasomes and the proteasome regulator PA28 during maturation, *Eur J Immunol* 29 [12], Seite 4037-42.
- Mackensen, A.; Carcelain, G.; Viel, S.; Raynal, M. C.; Michalaki, H.; Triebel, F.; Bosq, J. und Hercend, T. (1994): Direct evidence to support the immunosurveillance concept in a human regressive melanoma, *J Clin Invest* 93 [4], Seite 1397-402.
- Maleno, I.; Cabrera, C. M.; Cabrera, T.; Paco, L.; Lopez-Nevot, M. A.; Collado, A.; Ferron, A. und Garrido, F. (2004): Distribution of HLA class I altered phenotypes in colorectal carcinomas: high frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21, *Immunogenetics* 56 [4], Seite 244-53.
- Marincola, F. M.; Jaffee, E. M.; Hicklin, D. J. und Ferrone, S. (2000): Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance, *Adv Immunol* 74, Seite 181-273.
- Meyskens, F. L., Jr.; Kopecky, K.; Samson, M.; Hersh, E.; Macdonald, J.; Jaffe, H.; Crowley, J. und Coltman, C. (1990): Recombinant human interferon gamma: adverse effects in high-risk stage I and II cutaneous malignant melanoma, *J Natl Cancer Inst* 82 [12], Seite 1071.
- Mo, A. X.; van Lelyveld, S. F.; Craiu, A. und Rock, K. L. (2000): Sequences that flank subdominant and cryptic epitopes influence the proteolytic generation of MHC class I-presented peptides, *J Immunol* 164 [8], Seite 4003-10.
- Momburg, F.; Roelse, J.; Howard, J. C.; Butcher, G. W.; Hammerling, G. J. und Neefjes, J. J. (1994): Selectivity of MHC-encoded peptide transporters from human, mouse and rat, *Nature* 367 [6464], Seite 648-51.
- Morel, S.; Levy, F.; Burlet-Schiltz, O.; Brasseur, F.; Probst-Kepper, M.; Peitrequin, A. L.; Monsarrat, B.; Van Velthoven, R.; Cerottini, J. C.; Boon, T.; Gairin, J. E. und Van den Eynde, B. J. (2000): Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells, *Immunity* 12 [1], Seite 107-17.
- Myung, J.; Kim, K. B.; Lindsten, K.; Dantuma, N. P. und Crews, C. M. (2001): Lack of proteasome active site allostery as revealed by subunit-specific inhibitors, *Mol Cell* 7 [2], Seite 411-20.
- Nakatsukasa, K. und Brodsky, J. L. (2008): The recognition and retrotranslocation of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum, *Traffic* 9 [6], Seite 861-70.
- Neuner, A.; Schindel, M.; Wildenberg, U.; Muley, T.; Lahm, H. und Fischer, J. R. (2002): Prognostic significance of cytokine modulation in non-small cell lung cancer, *Int J Cancer* 101 [3], Seite 287-92.
- Nussbaum, A. K.; Dick, T. P.; Keilholz, W.; Schirle, M.; Stevanovic, S.; Dietz, K.; Heinemeyer, W.; Groll, M.; Wolf, D. H.; Huber, R.; Rammensee, H. G. und Schild, H. (1998): Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 [21], Seite 12504-9.
- Orlowski, M. und Wilk, S. (2000): Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex, *Arch Biochem Biophys* 383 [1], Seite 1-16.
- Osmulski, P. A. und Gaczynska, M. (2000): Atomic force microscopy reveals two conformations of the 20 S proteasome from fission yeast, *J Biol Chem* 275 [18], Seite 13171-4.
- Osmulski, P. A. und Gaczynska, M. (2002): Nanoenzymology of the 20S proteasome: proteasomal actions are controlled by the allosteric transition, *Biochemistry* 41 [22], Seite 7047-53.
- Owen-Schaub, L. B.; van Golen, K. L.; Hill, L. L. und Price, J. E. (1998): Fas and Fas ligand interactions suppress melanoma lung metastasis, *J Exp Med* 188 [9], Seite 1717-23.

- Peters, B.; Janek, K.; Kuckelkorn, U. und Holzhutter, H. G. (2002): Assessment of proteasomal cleavage probabilities from kinetic analysis of time-dependent product formation, *J Mol Biol* 318 [3], Seite 847-62.
- Pilon, M.; Schekman, R. und Romisch, K. (1997): Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation, *EMBO J* 16 [15], Seite 4540-8.
- Rabl, J.; Smith, D. M.; Yu, Y.; Chang, S. C.; Goldberg, A. L. und Cheng, Y. (2008): Mechanism of gate opening in the 20S proteasome by the proteasomal ATPases, *Mol Cell* 30 [3], Seite 360-8.
- Rammensee, H. G.; Friede, T. und Stevanović, S. (1995): MHC ligands and peptide motifs: first listing, *Immunogenetics* 41 [4], Seite 178-228.
- Rechsteiner, M. und Hill, C. P. (2005): Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors, *Trends Cell Biol* 15 [1], Seite 27-33.
- Rechsteiner, M.; Realini, C. und Ustrell, V. (2000): The proteasome activator 11 S REG (PA28) and class I antigen presentation, *Biochem J* 345 Pt 1, Seite 1-15.
- Reits, E.; Griekspoor, A.; Neijssen, J.; Groothuis, T.; Jalink, K.; van Veelen, P.; Janssen, H.; Calafat, J.; Drijfhout, J. W. und Neefjes, J. (2003): Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I, *Immunity* 18 [1], Seite 97-108.
- Rimoldi, D.; Muehlethaler, K.; Salvi, S.; Valmori, D.; Romero, P.; Cerottini, J. C. und Levy, F. (2001): Subcellular localization of the melanoma-associated protein Melan-AMART-1 influences the processing of its HLA-A2-restricted epitope, *J Biol Chem* 276 [46], Seite 43189-96.
- Rivoltini, L.; Carrabba, M.; Huber, V.; Castelli, C.; Novellino, L.; Dalerba, P.; Mortarini, R.; Arancia, G.; Anichini, A.; Fais, S. und Parmiani, G. (2002): Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte-tumor cell interaction, *Immunol Rev* 188, Seite 97-113.
- Rock, K. L.; Gramm, C.; Rothstein, L.; Clark, K.; Stein, R.; Dick, L.; Hwang, D. und Goldberg, A. L. (1994): Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules, *Cell* 78 [5], Seite 761-71.
- Rock, K. L.; York, I. A. und Goldberg, A. L. (2004): Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation, *Nat Immunol* 5 [7], Seite 670-7.
- Rock, K. L.; York, I. A.; Saric, T. und Goldberg, A. L. (2002): Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides, *Adv Immunol* 80, Seite 1-70.
- Romero, P.; Dunbar, P. R.; Valmori, D.; Pittet, M.; Ogg, G. S.; Rimoldi, D.; Chen, J. L.; Lienard, D.; Cerottini, J. C. und Cerundolo, V. (1998): Ex vivo staining of metastatic lymph nodes by class I major histocompatibility complex tetramers reveals high numbers of antigen-experienced tumor-specific cytolytic T lymphocytes, *J Exp Med* 188 [9], Seite 1641-50.
- Rubin, D. M.; Glickman, M. H.; Larsen, C. N.; Dhruvakumar, S. und Finley, D. (1998): Active site mutants in the six regulatory particle ATPases reveal multiple roles for ATP in the proteasome, *EMBO J* 17 [17], Seite 4909-19.
- Saric, T.; Chang, S. C.; Hattori, A.; York, I. A.; Markant, S.; Rock, K. L.; Tsujimoto, M. und Goldberg, A. L. (2002): An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides, *Nat Immunol* 3 [12], Seite 1169-76.
- Saveanu, L.; Carroll, O.; Hassainya, Y. und van Endert, P. (2005): Complexity, contradictions, and conundrums: studying post-proteasomal proteolysis in HLA class I antigen presentation, *Immunol Rev* 207, Seite 42-59.
- Schaffer, J. V.; Rigel, D. S.; Kopf, A. W. und Bolognia, J. L. (2004): Cutaneous melanoma--past, present, and future, *J Am Acad Dermatol* 51 [1 Suppl], Seite S65-9.
- Schmidtke, G.; Eggers, M.; Ruppert, T.; Groettrup, M.; Koszinowski, U. H. und Kloetzel, P. M. (1998): Inactivation of a defined active site in the mouse 20S proteasome complex enhances major histocompatibility complex class I antigen presentation of a murine cytomegalovirus protein, *J Exp Med* 187 [10], Seite 1641-6.
- Schmidtke, G.; Emch, S.; Groettrup, M. und Holzhutter, H. G. (2000): Evidence for the existence of a non-catalytic modifier site of peptide hydrolysis by the 20 S proteasome, *J Biol Chem* 275 [29], Seite 22056-63.
- Schmitz, A. und Herzog, V. (2004): Endoplasmic reticulum-associated degradation: exceptions to the rule, *Eur J Cell Biol* 83 [10], Seite 501-9.
- Schreiber, H.; Wu, T. H.; Nachman, J. und Kast, W. M. (2002): Immunodominance and tumor escape, *Semin Cancer Biol* 12 [1], Seite 25-31.
- Schubert, U.; Anton, L. C.; Gibbs, J.; Norbury, C. C.; Yewdell, J. W. und Bennink, J. R. (2000): Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes, *Nature* 404 [6779], Seite 770-4.
- Schultz, E. S. und Schuler, G. (2005): [Malignant melanoma. Diagnosis and therapy], *HNO* 53 [11], Seite 928-39.

- Schulze, A.; Standera, S.; Buerger, E.; Kikkert, M.; van Voorden, S.; Wiertz, E.; Koning, F.; Kloetzel, P. M. und Seeger, M. (2005): The ubiquitin-domain protein HERP forms a complex with components of the endoplasmic reticulum associated degradation pathway, *J Mol Biol* 354 [5], Seite 1021-7.
- Schwartz, A. L. und Ciechanover, A. (1999): The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human diseases, *Annu Rev Med* 50, Seite 57-74.
- Seeger, M.; Ferrell, K.; Frank, R. und Dubiel, W. (1997): HIV-1 tat inhibits the 20 S proteasome and its 11 S regulator-mediated activation, *J Biol Chem* 272 [13], Seite 8145-8.
- Selby, M.; Erickson, A.; Dong, C.; Cooper, S.; Parham, P.; Houghton, M. und Walker, C. M. (1999): Hepatitis C virus envelope glycoprotein E1 originates in the endoplasmic reticulum and requires cytoplasmic processing for presentation by class I MHC molecules, *J Immunol* 162 [2], Seite 669-76.
- Seliger, B.; Maeurer, M. J. und Ferrone, S. (2000): Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth, *Immunol Today* 21 [9], Seite 455-64.
- Shibatani, T.; Carlson, E. J.; Larabee, F.; McCormack, A. L.; Fruh, K. und Skach, W. R. (2006): Global organization and function of mammalian cytosolic proteasome pools: Implications for PA28 and 19S regulatory complexes, *Mol Biol Cell* 17 [12], Seite 4962-71.
- Sijts, A. J.; Ruppert, T.; Rehmann, B.; Schmidt, M.; Koszinowski, U. und Kloetzel, P. M. (2000): Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes, *J Exp Med* 191 [3], Seite 503-14.
- Sijts, A. J.; Standera, S.; Toes, R. E.; Ruppert, T.; Beekman, N. J.; van Veelen, P. A.; Ossendorp, F. A.; Melief, C. J. und Kloetzel, P. M. (2000): MHC class I antigen processing of an adenovirus CTL epitope is linked to the levels of immunoproteasomes in infected cells, *J Immunol* 164 [9], Seite 4500-6.
- Sijts, A.; Sun, Y.; Janek, K.; Kral, S.; Paschen, A.; Schadendorf, D. und Kloetzel, P. M. (2002): The role of the proteasome activator PA28 in MHC class I antigen processing, *Mol Immunol* 39 [3-4], Seite 165-9.
- Slingluff, C. L., Jr.; Colella, T. A.; Thompson, L.; Graham, D. D.; Skipper, J. C.; Caldwell, J.; Brinckerhoff, L.; Kittlesen, D. J.; Deacon, D. H.; Oei, C.; Harthun, N. L.; Huczko, E. L.; Hunt, D. F.; Darrow, T. L. und Engelhard, V. H. (2000): Melanomas with concordant loss of multiple melanocytic differentiation proteins: immune escape that may be overcome by targeting unique or undefined antigens, *Cancer Immunol Immunother* 48 [12], Seite 661-72.
- Smith, D. M.; Chang, S. C.; Park, S.; Finley, D.; Cheng, Y. und Goldberg, A. L. (2007): Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry, *Mol Cell* 27 [5], Seite 731-44.
- Speiser, D. E.; Cerottini, J. C. und Romero, P. (2005): Tumor cell recognition efficiency by T cells, *PLoS Med* 2 [3], Seite e77; author reply e95.
- Stewart, T. J. und Abrams, S. I. (2008): How tumours escape mass destruction, *Oncogene* 27 [45], Seite 5894-903.
- Stohwasser, R.; Salzmann, U.; Giesebrecht, J.; Kloetzel, P. M. und Holzhutter, H. G. (2000): Kinetic evidences for facilitation of peptide channelling by the proteasome activator PA28, *Eur J Biochem* 267 [20], Seite 6221-30.
- Stohwasser, R.; Standera, S.; Peters, I.; Kloetzel, P. M. und Groettrup, M. (1997): Molecular cloning of the mouse proteasome subunits MC14 and MECL-1: reciprocally regulated tissue expression of interferon-gamma-modulated proteasome subunits, *Eur J Immunol* 27 [5], Seite 1182-7.
- Stoltze, L.; Nussbaum, A. K.; Sijts, A.; Emmerich, N. P.; Kloetzel, P. M. und Schild, H. (2000): The function of the proteasome system in MHC class I antigen processing, *Immunol Today* 21 [7], Seite 317-9.
- Strehl, B.; Joeris, T.; Rieger, M.; Visekruna, A.; Textoris-Taube, K.; Kaufmann, S. H.; Kloetzel, P. M.; Kuckelkorn, U. und Steinhoff, U. (2006): Immunoproteasomes are essential for clearance of *Listeria monocytogenes* in nonlymphoid tissues but not for induction of bacteria-specific CD8+ T cells, *J Immunol* 177 [9], Seite 6238-44.
- Strehl, B.; Seifert, U.; Kruger, E.; Heink, S.; Kuckelkorn, U. und Kloetzel, P. M. (2005): Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing, *Immunol Rev* 207, Seite 19-30.
- Sun, Y.; Sijts, A. J.; Song, M.; Janek, K.; Nussbaum, A. K.; Kral, S.; Schirle, M.; Stevanovic, S.; Paschen, A.; Schild, H.; Kloetzel, P. M. und Schadendorf, D. (2002): Expression of the proteasome activator PA28 rescues the presentation of a cytotoxic T lymphocyte epitope on melanoma cells, *Cancer Res* 62 [10], Seite 2875-82.
- Tanahashi, N.; Murakami, Y.; Minami, Y.; Shimbara, N.; Hendil, K. B. und Tanaka, K. (2000): Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis, *J Biol Chem* 275 [19], Seite 14336-45.

- Textoris-Taube, K.; Henklein, P.; Pollmann, S.; Bergann, T.; Weisshoff, H.; Seifert, U.; Drung, I.; Mugge, C.; Sijts, A.; Kloetzel, P. M. und Kuckelkorn, U. (2007): The N-terminal flanking region of the TRP2360-368 melanoma antigen determines proteasome activator PA28 requirement for epitope liberation, *J Biol Chem* 282 [17], Seite 12749-54.
- Thant, A. A.; Nawa, A.; Kikkawa, F.; Ichigotani, Y.; Zhang, Y.; Sein, T. T.; Amin, A. R. und Hamaguchi, M. (2000): Fibronectin activates matrix metalloproteinase-9 secretion via the MEK1-MAPK and the PI3K-Akt pathways in ovarian cancer cells, *Clin Exp Metastasis* 18 [5], Seite 423-8.
- Thomas, D. A. und Massague, J. (2005): TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance, *Cancer Cell* 8 [5], Seite 369-80.
- Toes, R. E.; Nussbaum, A. K.; Degermann, S.; Schirle, M.; Emmerich, N. P.; Kraft, M.; Laplace, C.; Zwinderman, A.; Dick, T. P.; Muller, J.; Schonfisch, B.; Schmid, C.; Fehling, H. J.; Stevanovic, S.; Rammensee, H. G. und Schild, H. (2001): Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products, *J Exp Med* 194 [1], Seite 1-12.
- Unno, M.; Mizushima, T.; Morimoto, Y.; Tomisugi, Y.; Tanaka, K.; Yasuoka, N. und Tsukihara, T. (2002): The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution, *Structure* 10 [5], Seite 609-18.
- Van den Eynde, B. J. und Boon, T. (1997): Tumor antigens recognized by T lymphocytes, *Int J Clin Lab Res* 27 [2], Seite 81-6.
- Van den Eynde, B. J. und Morel, S. (2001): Differential processing of class-I-restricted epitopes by the standard proteasome and the immunoproteasome, *Curr Opin Immunol* 13 [2], Seite 147-53.
- van Hall, T.; Sijts, A.; Camps, M.; Offringa, R.; Melief, C.; Kloetzel, P. M. und Ossendorp, F. (2000): Differential influence on cytotoxic T lymphocyte epitope presentation by controlled expression of either proteasome immunosubunits or PA28, *J Exp Med* 192 [4], Seite 483-94.
- Van Kaer, L.; Ashton-Rickardt, P. G.; Ploegh, H. L. und Tonegawa, S. (1992): TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4-8+ T cells, *Cell* 71 [7], Seite 1205-14.
- Verma, R.; Aravind, L.; Oania, R.; McDonald, W. H.; Yates, J. R., 3rd; Koonin, E. V. und Deshaies, R. J. (2002): Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome, *Science* 298 [5593], Seite 611-5.
- Vyas, J. M.; Van der Veen, A. G. und Ploegh, H. L. (2008): The known unknowns of antigen processing and presentation, *Nat Rev Immunol* 8 [8], Seite 607-18.
- Wang, J. und Maldonado, M. A. (2006): The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases, *Cell Mol Immunol* 3 [4], Seite 255-61.
- Wang, Y.; Chen, D. und Androlewicz, M. J. (1999): The role of endoplasmic reticulum-associated protein degradation in MHC class I antigen processing, *Immunol Rev* 172, Seite 67-72.
- Weinzierl, A. O.; Rudolf, D.; Hillen, N.; Tenzer, S.; van Endert, P.; Schild, H.; Rammensee, H. G. und Stevanovic, S. (2008): Features of TAP-independent MHC class I ligands revealed by quantitative mass spectrometry, *Eur J Immunol* 38 [6], Seite 1503-10.
- Whitby, F. G.; Masters, E. I.; Kramer, L.; Knowlton, J. R.; Yao, Y.; Wang, C. C. und Hill, C. P. (2000): Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators, *Nature* 408 [6808], Seite 115-20.
- Whiteside, T. L. (2002): Tumor-induced death of immune cells: its mechanisms and consequences, *Semin Cancer Biol* 12 [1], Seite 43-50.
- Yao, T. und Cohen, R. E. (2002): A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome, *Nature* 419 [6905], Seite 403-7.
- Ye, Y.; Meyer, H. H. und Rapoport, T. A. (2001): The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol, *Nature* 414 [6864], Seite 652-6.
- Ye, Y.; Meyer, H. H. und Rapoport, T. A. (2003): Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains, *J Cell Biol* 162 [1], Seite 71-84.
- Ye, Y.; Shibata, Y.; Yun, C.; Ron, D. und Rapoport, T. A. (2004): A membrane protein complex mediates retrotranslocation from the ER lumen into the cytosol, *Nature* 429 [6994], Seite 841-7.
- Yewdell, J. (2002): To DRiP or not to DRiP: generating peptide ligands for MHC class I molecules from biosynthesized proteins, *Mol Immunol* 39 [3-4], Seite 139-46.
- York, I. A.; Mo, A. X.; Lemerise, K.; Zeng, W.; Shen, Y.; Abraham, C. R.; Saric, T.; Goldberg, A. L. und Rock, K. L. (2003): The cytosolic endopeptidase, thimet oligopeptidase, destroys antigenic peptides and limits the extent of MHC class I antigen presentation, *Immunity* 18 [3], Seite 429-40.



- Zaiss, D. M.; Standera, S.; Holzhutter, H.; Kloetzel, P. und Sijts, A. J. (1999): The proteasome inhibitor PI31 competes with PA28 for binding to 20S proteasomes, FEBS Lett 457 [3], Seite 333-8.
- Zaiss, D. M.; Standera, S.; Kloetzel, P. M. und Sijts, A. J. (2002): PI31 is a modulator of proteasome formation and antigen processing, Proc Natl Acad Sci U S A 99 [22], Seite 14344-9.
- Zhang, Z.; Krutchinsky, A.; Endicott, S.; Realini, C.; Rechsteiner, M. und Standing, K. G. (1999): Proteasome activator 11S REG or PA28: recombinant REG alpha/REG beta hetero-oligomers are heptamers, Biochemistry 38 [17], Seite 5651-8.

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAA ATPase	<i>ATPases associated with various cellular activities</i>	Melan-A	<i>melanoma antigen-A</i>
Abb.	Abbildung	min	Minute(n)
AKT/PKP	Proteinkinase B	NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
β2m	β2-Mikroglobulin	OD	optische Dichte
BiP	<i>binding protein</i>	PA28	Proteasomaktivator 28
ChT-L	chymotrypsinähnlich	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
CHX	Cycloheximid	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
CTL	cytotoxische T-Lymphozyten	PGPH	peptidylglutamylspaltende
D	Dalton (1 D = g/mol)	POD	Peroxidase
DC	Dendritische Zellen	pro	Proform
DMSO	Dimethylsulfoxid	rev	<i>reverse</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RNA	Ribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	RPD	<i>rapidly degraded products</i>
DRiPs	<i>defective ribosomal products</i>	rpm	<i>rotations per minute</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus	S	Sedimentationskoeffizient
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	SDS	Natriumdodecylsulfat
E:T	Effektor:Target	sec	Sekunde(n)
Epox	Epoxomicin	siRNA	<i>short interference RNA</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum	sol	<i>soluble</i>
ERAD	ER-assoziierte Degradation	SP	Standardproteasom(en)
ERAP	<i>endoplasmic reticulum aminopeptidase</i>	TAA	Tumor-assoziierte(s) Antigen(e)
for	<i>forward</i>	Tab.	Tabelle
g	Gramm	TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
h	Stunde	TGF-β	<i>transforming growth factor-β</i>
HBV	humanes Hepatitis B Virus	THOP	<i>thimet oligopeptidase</i>
HC	<i>heavy chain</i>	T-L	trypsinähnlich
HCMV	humanes Cytomegalievirus	TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
HERP	<i>homocysteine-induced endoplasmic reticulum protein</i>	TPPII	<i>tripeptidyl peptidase II</i>
IMP	interremidäre(r) Proteasomsubtyp(en)	TRP2	<i>tyrosinase related protein 2</i>
INFγ	Interferon gamma	U	<i>Unit</i>
IP	Immunoproteasom(en)	ü.N.	über Nacht
k	Kilo	Ub	Ubiquitin
kb	Kilobasen	UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
l	Liter	v/v	<i>volume/volume</i>
LAP	<i>leucine aminopeptidase</i>	VCP	<i>valosin containig protein</i>
M	molar (mol/l)	VIMP	<i>VCP interacting membrane protein</i>
mat	maturierte Protein	w/v	<i>weight/volume</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>		

## PUBLIKATIONEN

Eingereicht beim Journal of Experimental Medicine

Keller M., Ebstein F., Paschen A., Kny M., Seeger M., Bürger E., Schadendorf D., Kloetzel P. M., Seifert U. (2009): Deregulation of the endoplasmic reticulum associated degradation (ERAD) pathway mediates immune escape of malignant melanoma

### Poster

Keller M., Ebstein F., Paschen A., Schadendorf D., Kloetzel P. M., Seifert U.: Defects of the antigen processing machinery leading to T Cell resistance of melanoma cells, 3rd Charité Zeuthener See Workshop, 2007, Berlin

Keller M., Paschen A., Ebstein F., Textoris-Taube K., Krüger E., Schadendorf D., Kloetzel P. M., Seifert U.: Impact on intermediate-type proteasomes in viral and tumor antigen presentation, Third intracellular proteolysis meeting, 2008, Santa Cruz de Tenerife, Spanien

Berlin, 03.03.2009

## DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Prof. Peter-Michael Kloetzel für die hervorragenden Arbeitsbedingungen, die konstruktiven Diskussionen und die humorvolle Atmosphäre.

Dr. Ulrike Seifert danke ich herzlich für die interessante Themenstellung und ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung.

Einen besonderen Dank für ihre Unterstützung möchte ich Prof. Burkhardt Dahmann, Dr. Elke Krüger, Elke Bürger, Dr. Frédéric Ebstein, Ingrid Krenz, Dagmar Siele und Sabrina Urban aussprechen.

Ebenfalls sei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Kloetzel für ihre Hilfsbereitschaft und das sehr gute Arbeitsklima gedankt.

Zuletzt möchte ich mich bei Benjamin Fricke für die breite Unterstützung und vielen Anregungen bedanken.

## **ERKLÄRUNG**

Hiermit versichere ich, die Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Berlin, 03.03.2009

Martin Keller